

明 細 書

糖鎖を有する標的指向性および腸管吸収制御性リポソームならびに
それを含む癌治療薬および診断薬

技術分野

本発明は、医薬品、化粧品をはじめ医学・薬学分野において応用し得る、癌などの標的細胞・組織を認識し局所的に薬剤や遺伝子を患部に送り込むための治療用のドラッグデリバリーシステムや診断用の細胞・組織センシングプローブとして利用できるものであって、特に腸管吸収性に優れた糖鎖修飾リポソーム、およびこれに薬剤あるいは遺伝子等を封入したリポソーム製剤に関する。

背景技術

米国の国家ナノテク戦略（NNI）によって実現を目指す具体的目標の一例として、「癌細胞や標的組織を狙い撃ちする薬物や遺伝子送達システム（DDS：ドラッグデリバリーシステム）」を掲げた。日本の総合科学技術会議のナノテクノロジー・材料分野推進戦略でも、重点領域として「医療用極小システム・材料、生物のメカニズムを活用し制御するナノバイオロジー」があり、その5年間の研究開発目標の1つとして「健康寿命延伸のための生体機能材料・ピンポイント治療等技術の基本シーズ確立」が掲げられている。一方、高齢化社会となるに伴い癌の罹患率・死亡率は年々増えており、新規な治療材料である標的指向DDSの開発が待望されている。その他の病気においても副作用のない標的指向DDSナノ材料の重要性が注目されており、その市場規模は近い将来に10兆円を超えると予測されている。また、これらの材料は治療とともに診断への利用においても期待されている。

医薬品の治療効果は、薬物が特定の標的部位に到達し、そこで作用することにより発現される。その一方で、医薬品による副作用とは、薬物が不必要な部位に作用してしまうことである。従って、薬物を有効かつ安全に使用するためにもドラッグデリバリーシステムの開発が求められている。その中でも特に標的指向(タ

ーゲティング) DDSとは、薬物を「体内の必要な部位に」、「必要な量を」、「必要な時間だけ」送り込むといった概念である。そのための代表的な材料としての微粒子性キャリアーであるリポソームが注目されている。この粒子に標的指向機能をもたせるために、リポソームの脂質の種類、組成比、粒子径、表面電荷を変化させるなどの受動的ターゲティング法が試みられているが、いまだ本法は不十分であり更なる改良が求められている。

一方、高機能のターゲティングを可能にするために、能動的ターゲティング法も試みられている。これは“ミサイルドラッグ”ともよばれ理想的なターゲティング法であるが、国内外においていまだ完成されたものはなく今後の発展が大いに期待されているものである。本法は、リポソーム膜面上にリガンドを結合させ、標的組織の細胞膜面上に存在するレセプターに特異的に認識させることによって、積極的にターゲティングを可能にさせる方法である。この能動的ターゲティング法での標的となる細胞膜面上に存在するレセプターのリガンドとしては、抗原、抗体、ペプチド、糖脂質や糖蛋白質などが考えられる。これらのうち、糖脂質や糖蛋白質の糖鎖は、生体組織の発生や形態形成、細胞の増殖や分化、生体防御や受精機構、癌化とその転移機構などの様々な細胞間コミュニケーションにおいて情報分子としての重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。

また、その標的となる各組織の細胞膜面上に存在するレセプターとしてのセレクチン、DC-SIGN、DC-SIGNR、コレクチン、マンノース結合蛋白質等のC-タイプレクチン、シグレック等のIタイプレクチン、マンノース-6-リン酸受容体などのPタイプレクチン、Rタイプレクチン、Lタイプレクチン、Mタイプレクチン、ガレクチンなどの各種のレクチン(糖鎖認識蛋白質)についての研究も進んできたことから、各種の分子構造を有する糖鎖は新しいDDSリガンドとして注目されてきている (1)Yamazaki, N., Kojima, S., Bovin, N.V., Andre, S., Gabius, S. and Gabius, H.-J. (2000) Adv. Drug Delivery Rev. 43, 225-244. 2)Yamazaki, N., Jigami, Y., Gabius, H.-J., Kojima, S (2001) Trends in Glycoscience and Glycotechnology 13, 319-329. <http://www.gak.co.jp/TIGG/71PDF/yamazaki.pdf>).

外膜表面にリガンドを結合したリポソームについては、癌などの標的部位に選

択的に薬物や遺伝子などを送達するためのDDS材料として多くの研究がなされてきた。しかしながら、それらは、生体外では標的細胞に結合するが、生体内では期待される標的細胞や組織にターゲティングされないものがほとんどである

(1)Forssen, E. and Willis, M. (1998) Adv. Drug Delivery Rev. 29, 249-271.
2)高橋俊雄・橋田充編(1999)、今日のDDS・薬物送達システム、159-167 頁、医薬ジャーナル社、大阪)。糖鎖の分子認識機能を利用したDDS材料の研究開発においても、糖鎖を有する糖脂質を導入したリポソームについて若干の研究が知られているが、それらの機能評価は生体外 (in vitro) によるもののみであり、糖鎖を有する糖蛋白質を導入したリポソームの研究はほとんど進んでいない

(1)DeFrees, S.A., Phillips, L., Guo, L. and Zalipsky, S. (1996) J. Am. Chem. Soc. 118, 6101-6104. 2)Spevak, W., Foxall, C., Charych, D.H., Dasgupta, F. and Nagy, J.O. (1996) J. Med. Chem. 39, 1018-1020. 3)Stahn, R., Schafer, H., Kernchen, F. and Schreiber, J. (1998) Glycobiology 8, 311-319, 4)Yamazaki, N., Jigami, Y., Gabius, H.-J., Kojima, S (2001) Trends in Glycoscience and Glycotechnology 13, 319-329. <http://www.gak.co.jp/TIGG/71PDF/yamazaki.pdf>)。したがって、糖脂質や糖蛋白質の多種多様な糖鎖を結合したリポソームについての調製法と生体内動態 (in vivo) 解析を含めた体系的な研究は、これまで未開発で今後の進展が期待される重要課題である。

白血病はその病態の解析及び治療法が最も進歩したガンのひとつである。その治療法は化学療法を主体としているが、寛解（治癒）の可能性があるだけにその化学療法は非常に強力に行われ、それによる副作用も非常に強い物があるのが現状である。

近年、高齢者の増加に伴い高齢者白血病患者の増加が報告されている。急性骨髄性白血病においては60歳以上の患者が50%を占める状態になっている。しかしながら近年の白血病治療の進歩は高齢者白血病患者の治療成績向上にはかならずしも貢献していなかった。これには以下の理由が考えられている。一つには高齢患者には染色体異常や薬剤耐性白血病細胞の出現など予後不良因子が高頻度に見られること。またもう一つには抗癌剤投与による感染合併、骨髄障害そして抗

癌剤による臓器傷害に対する許容能の低下である。つまり高齢患者には若年者に対して施行される強力な化学療法が行われにくいのが現状である。

これらの解決には抗癌剤に対する感受性増進方法の開発、分子標的薬の開発等行われているが、理想的な薬剤分布をもたらす Drug Delivery System (以下 DDS) の開発も大きな解決策のひとつと考えられる。DDS による理想的薬剤分布は臓器傷害の程度を軽減し、かつ白血病細胞に対する細胞傷害性を高められる可能性があり、高齢白血病患者の治療成績を改善させ得るものである。

さらに新しいタイプの DDS 材料研究として、投与が最も簡便・安価に行える経口投与で使用可能な DDS 材料開発も重要課題である。たとえば、ペプチド性および蛋白質性医薬品などは一般的に水溶性で高分子量であり消化管の小腸粘膜透過性が低いため酵素分解を受けるなどにより経口投与してもほとんど腸管吸収されない。そこでこれらの高分子量の医薬品や遺伝子などを腸管から血液中へ送達するための DDS 材料としてリガンド結合リポソームの研究が注目されつつある (Lehr, C.-M. (2000) J. Controlled Release 65, 19-29)。しかしながら、これらのリガンドとして糖鎖を用いた腸管吸収制御性リポソームの研究は未だ報告されていない。

本発明者等は、既に、糖鎖がリンカー蛋白質を介してリポソーム膜に結合されており、糖鎖が、ルイス X 型三糖鎖、シアリルルイス X 型四糖鎖、3'-シアリルラクトサミン三糖鎖、6'-シアリルラクトサミン三糖鎖から選ばれたものであり、リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質にトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンが任意に結合しており親水性化されていることを特徴とする糖鎖修飾リポソームおよびラクトース 2 糖鎖、2'-フコシルラクトース三糖鎖、ジフコシルラクトース四糖鎖および 3-フコシルラクトース三糖鎖から選ばれた糖鎖により修飾されたりポソームであって、糖鎖がリンカー蛋白質を介してリポソームに結合していてもよい、腸管吸収制御性リポソームについて特許出願を行っている。

発明の開示

本発明は、各種組織の細胞表面上に存在する各種のレクチン (糖鎖認識蛋白質) に対して特異的な結合活性を有する糖鎖を結合したりポソームであって、実際の

生体内の細胞、組織を識別して薬剤あるいは遺伝子を効率的に輸送し得るリポソームを提供することを目的とする。さらに、本発明は、該リポソームを含む疾患治療剤の提供をも目的とする。さらに、本発明は安定性の高いリポソームの提供を目的とする。

上記の課題を解決するために、本発明者等は、リポソームの組成について検討を行い、安定性の高いリポソームを得た。さらに、リポソームの表面に結合させる糖鎖の種類および結合密度、リンカー蛋白質、ならびにリポソームを親水化するための化合物等について種々の実験、検討を加え、糖鎖の構造により各組織への指向性を実際に制御できることに加え、リポソーム表面および／またはリンカー蛋白質を特定の親水性化合物により水和処理し、さらにリポソームに結合する糖鎖の密度を制御すれば、各組織に対するリポソームの移行量をさらに増大し得、これにより薬剤あるいは遺伝子を標的細胞、組織に効率的に輸送できることを見だし、本発明を完成するに至ったものである。

本発明者らは、さらにこのようにして得られたリポソームを実際に疾患の治療に用いることについて鋭意検討を行い、表面に結合させた糖鎖の種類に応じて種々の組織および器官の種々の疾患に適用できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

本発明者らは、さらに毒性が問題となる抗癌剤ドキソルビシンをリポソームに包埋することにより毒性を軽減した。しかしこれだけでは薬剤の安全性は上がるものの白血病細胞に対しても細胞傷害性が低下してしまう。そこでリポソームに糖鎖を結合させ積極的に白血病細胞に集積させ得る DDS を完成させた。

すなわち、本発明は、以下の 1～79 に係るものである。

1. 糖鎖がリポソーム膜に結合されている糖鎖修飾リポソーム。
2. リポソームの構成脂質が、フォスファチジルコリン類(モル比 0～70%)、フォスファチジルエタノールアミン類(モル比 0～30%)、フォスファチジン酸類、長鎖アルキルリン酸塩類およびジセチルリン酸類からなる群から選択される 1 種以上の脂質(モル比 0～30%)、ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類およびスフィンゴミエリン類からなる群から選択される 1 種以上の脂質(モル比 0～40%)、ならびにコレステロール類(モル比 0～70%)を含む、

1 記載の糖鎖修飾リポソーム。

3. ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類、スフィンゴミエリン類およびコレステロール類からなる群から選択される少なくとも 1 種の脂質がリポソーム表面上で集合しラフトを形成している 2 記載の糖鎖修飾リポソーム。

4. 糖鎖の種類および密度が制御されて結合されている、1 から 3 のいずれかに記載の糖鎖修飾リポソーム。

5. リポソームの粒径が 30~500nm である、1 から 4 のいずれかに記載の糖鎖修飾リポソーム。

6. リポソームの粒径が 50~350nm である、5 記載の糖鎖修飾リポソーム。

7. リポソームのゼータ電位が-50~10mV である、1 から 6 のいずれかに記載の糖鎖修飾リポソーム。

8. リポソームのゼータ電位が-40~0mV である、7 記載の糖鎖修飾リポソーム。

9. リポソームのゼータ電位が-30~-10mV である、8 記載の糖鎖修飾リポソーム。

10. 糖鎖がリンカー蛋白質を介してリポソーム膜に結合されている、1 から 9 のいずれかに記載の糖鎖修飾リポソーム。

11. リンカー蛋白質が生体由来蛋白質である 10 記載の糖鎖修飾リポソーム。

12. リンカー蛋白質がヒト由来蛋白質である 11 記載の糖鎖修飾リポソーム。

13. リンカー蛋白質がヒト由来血清蛋白質である 12 記載の糖鎖修飾リポソーム。

14. リンカー蛋白質がヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンである 13 記載の糖鎖修飾リポソーム。

15. リンカー蛋白質がリポソーム表面上に形成されているガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類、スフィンゴミエリン類およびコレステロール類からなる群から選択される少なくとも 1 種の脂質からなるラフ

ト上に結合している 1 から 14 のいずれかに記載の糖鎖修飾リポソーム。

16. リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質に親水性化合物が結合することにより親水性化されている、1 から 15 のいずれかに記載の糖鎖修飾リポソーム。

17. 親水性化合物が低分子物質である、16 記載の糖鎖修飾リポソーム。

18. 親水性化合物が糖鎖に対する立体障害となりにくく標的細胞膜面上のレクチンによる糖鎖分子認識反応の進行を妨げない、16 または 17 記載の糖鎖修飾リポソーム。

19. 親水性化合物が水酸基を有する 16 から 18 のいずれかに記載の糖鎖修飾リポソーム。

20. 親水性化合物がアミノアルコール類である 16 から 19 のいずれかに記載の糖鎖修飾リポソーム。

21. 親水性化合物がリポソーム膜表面に直接結合している項 16 から 20 のいずれかに記載の糖鎖修飾リポソーム。

22. 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式 (1)

$$X-R1(R2OH)_n \quad \text{式 (1)}$$

で示される 16 記載の糖鎖修飾リポソームであって、R1 は、C1 から C40 の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R2 は存在しないかもしくは C1 から C40 の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、X はリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、n は自然数を示す、糖鎖修飾リポソーム。

23. 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式 (2)

$$H_2N-R3-(R4OH)_n \quad \text{式 (2)}$$

で示される 16 記載の糖鎖修飾リポソームであって、R3 は、C1 から C40 の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R4 は存在しないかもしくは C1 から C40 の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、H₂N はリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、n は自然数を示す、糖鎖修飾リポソーム。

24. 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式 (3)

$H_2N-R5(OH)_n$ 式 (3)

で示される 16 記載の糖鎖修飾リポソームであって、R5 は、C1 から C40 の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 H_2N はリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、n は自然数を示す、糖鎖修飾リポソーム。

25. リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質にトリス（ヒドロキシアルキル）アミノアルカンである親水性化合物を共有結合により結合させることによりリポソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、16 記載の糖鎖修飾リポソーム。

26. リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質にトリス（ヒドロキシメチル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノプロパン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノプロパン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノプロパンからなる群から選択される親水性化合物を共有結合により結合させることによりリポソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、25 記載の糖鎖修飾リポソーム。

27. 糖鎖修飾リポソームが、各組織の細胞膜面上に存在するレセプターとしてのセ렉チン、DC-SIGN、DC-SGMR、コレクチンおよびマンノース結合レクチンを含む C-タイプレクチン、シグレックを含む I タイプレクチン、マンノース-6-リン酸受容体を含む P タイプレクチン、R タイプレクチン、L タイプレクチン、M タイプレクチン、ガレクチンからなる群から選択されるレクチンを標的とする 1 から 26 のいずれかに記載の糖鎖修飾リポソーム。

28. 糖鎖修飾リポソームが E-セ렉チン、P-セ렉チンおよび L-セ렉チンからなる群から選択されるセ렉チンを標的とする 28 記載の糖鎖修飾リポソーム。

29. リポソームに結合した糖鎖の結合密度が、リンカー蛋白質を用いる場合は、リポソーム 1 粒子当たり 1 ～ 30000 個であり、リンカー蛋白質を用いない場

合は、リポソーム 1 粒子当り最高 1~500000 個である、1 から 28 のいずれかに記載の糖鎖修飾リポソーム。

30. リポソームに結合した糖鎖の結合密度が、リポソームに結合させる蛋白質 1 分子当り 1~60 個である、1 から 28 のいずれかに記載の糖鎖修飾リポソーム。

31. リポソームが腸管吸収機能を有するものである 1 から 30 のいずれかに記載の糖鎖修飾リポソーム。

32. 血中、肝臓、脾臓、肺、脳、小腸、心臓、胸腺、腎臓、膵臓、筋肉、大腸、骨、骨髓、眼、癌組織、炎症組織およびリンパ節からなる群から選択される組織または器官に指向性の高い、1 から 31 のいずれかに記載の糖鎖修飾リポソーム。

33. 糖鎖がリポソーム膜に結合されているものであって、糖鎖が、アルファ 1,2 マンノビオース二糖鎖、アルファ 1,3 マンノビオース二糖鎖、アルファ 1,4 マンノビオース二糖鎖、アルファ 1,6 マンノビオース二糖鎖、アルファ 1,3 アルファ 1,6 マンノトリオース三糖鎖、オリゴマンノース 3 五糖鎖、オリゴマンノース 4 b 六糖鎖、オリゴマンノース 5 七糖鎖、オリゴマンノース 6 八糖鎖、オリゴマンノース 7 九糖鎖、オリゴマンノース 8 十糖鎖、オリゴマンノース 9 十一糖鎖、3'-シアリルラクトース三糖鎖、6'-シアリルラクトース三糖鎖、3'-シアリルラクトサミン三糖鎖、6'-シアリルラクトサミン三糖鎖、ルイス X 型三糖鎖、シアリルルイス X 型四糖鎖、ラクトース二糖鎖、2'-フコシルラクトース三糖鎖、ジフコシルラクトース四糖鎖および 3-フコシルラクトース三糖鎖からなる群から選択される、1 から 32 のいずれかに記載の糖鎖修飾リポソーム。

34. 1 から 33 のいずれかに記載のリポソームに薬剤または遺伝子を封入したリポソーム製剤。

35. 薬剤が、アルキル化系抗癌剤、代謝拮抗剤、植物由来抗癌剤、抗癌性抗生物質、BRM・サイトカイン類、白金錯体系抗癌剤、免疫療法剤、ホルモン系抗癌剤、モノクローナル抗体等の腫瘍用薬剤、中枢神経用薬剤、末梢神経系・感覚器官用薬剤、呼吸器疾患治療薬剤、循環器用薬剤、消化器官用薬剤、ホルモン系用薬剤、泌尿器・生殖器用薬剤、外用薬剤、ビタミン・滋養強壮剤、血液・体液

用薬剤、代謝性医薬品、抗生物質・化学療法薬剤、検査用薬剤、抗炎症剤、眼疾患薬剤、中枢神経系薬剤、自己免疫系薬剤、循環器系薬剤、糖尿病、高脂血症等の生活習慣病薬剤または経口、経肺、経皮膚もしくは経粘膜のための各種薬剤、副腎皮質ホルモン、免疫抑制剤、抗菌薬、抗ウイルス薬、血管新生抑制剤、サイトカインやケモカイン、抗サイトカイン抗体や抗ケモカイン抗体、抗サイトカイン・ケモカイン受容体抗体、siRNA、miRNA、smRNA、アンチセンス ODN や DNA などの遺伝子治療関連の核酸製剤、神経保護因子、抗体医薬からなる群から選択される 3 4 記載のリポソーム製剤。

3 6. 経口投与用製剤である、3 4 または 3 5 に記載のリポソーム製剤。

3 7. 非経口投与用製剤である、3 4 または 3 5 に記載のリポソーム製剤。

3 8. 糖鎖修飾リポソームを含む薬剤が、ドキソルビシンである 3 5 記載のリポソーム製剤。

3 9. 薬剤が腫瘍用薬剤である、3 5 記載のリポソーム製剤を含む抗癌剤。

4 0. 経口投与用抗癌剤である、3 9 記載の抗癌剤。

4 1. 非経口投与用抗癌剤である、3 9 記載の抗癌剤。

4 2. リポソーム膜が親水性化されており、表面に糖鎖が結合していないリポソーム。

4 3. リポソームの構成脂質が、フォスファチジルコリン類(モル比 0 ~ 70%)、フォスファチジリエタノールアミン類(モル比 0 ~ 30%)、フォスファチジン酸類、長鎖アルキルリン酸塩類およびジセチルリン酸類からなる群から選択される 1 種以上の脂質(モル比 0 ~ 30%)、ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジलगリセロール類およびスフィンゴミエリン類からなる群から選択される 1 種以上の脂質(モル比 0 ~ 40%)、ならびにコレステロール類(モル比 0 ~ 70%)を含む、4 2 記載のリポソーム。

4 4. さらに、蛋白質を含む 4 2 または 4 3 に記載のリポソーム。

4 5. リポソーム膜に親水性化合物が結合することにより親水性化されている、4 2 から 4 4 のいずれかに記載のリポソーム。

4 6. 親水性化合物が低分子物質である、4 5 記載のリポソーム。

4 7. 親水性化合物が糖鎖に対する立体障害となりにくく標的細胞膜面上の

レクチンによる糖鎖分子認識反応の進行を妨げない、45または46記載のリポソーム。

48. 親水性化合物が水酸基を有する45から47のいずれかに記載のリポソーム。

49. 親水性化合物がアミノアルコール類である45から48のいずれかに記載のリポソーム。

50. 親水性化合物がリポソーム膜表面に直接結合している45から49のいずれかに記載のリポソーム。

51. 低分子の親水性化合物が少なくとも1つのOH基を有する化合物である、45記載のリポソーム。

52. 親水性化合物が、一般式(1)

$$X-R1(R2OH)_n$$
 式(1)

で示される45記載のリポソームであって、R1は、C1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R2は存在しないかもしくはC1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、Xはリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、nは自然数を示す、リポソーム。

53. 親水性化合物が、一般式(2)

$$H_2N-R3-(R4OH)_n$$
 式(2)

で示される45記載のリポソームであって、R3は、C1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R4は存在しないかもしくはC1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 H_2N はリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、nは自然数を示す、リポソーム。

54. 親水性化合物が、一般式(3)

$$H_2N-R5(OH)_n$$
 式(3)

で示される45記載のリポソームであって、R5は、C1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 H_2N はリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、nは自然数を示す、リポソーム。

ーム。

55. リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質にトリス（ヒドロキシアルキル）アミノアルカンである親水性化合物を共有結合により結合させることによりリポソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、45記載のリポソーム。

56. リポソーム膜にトリス（ヒドロキシメチル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノプロパン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノプロパン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノプロパンからなる群から選択される親水性化合物を共有結合により結合させることによりリポソーム膜が親水性化されている、55記載のリポソーム。

57. 42から56のいずれかに記載のリポソームに薬剤または遺伝子を封入したリポソーム製剤。

58. 薬剤が、アルキル化系抗癌剤、代謝拮抗剤、植物由来抗癌剤、抗癌性抗生物質、BRM・サイトカイン類、白金錯体系抗癌剤、免疫療法剤、ホルモン系抗癌剤、モノクローナル抗体等の腫瘍用薬剤、中枢神経用薬剤、末梢神経系・感覚器官用薬剤、呼吸器疾患治療薬剤、循環器用薬剤、消化器官用薬剤、ホルモン系用薬剤、泌尿器・生殖器用薬剤、外用薬剤、ビタミン・滋養強壮剤、血液・体液用薬剤、代謝性医薬品、抗生物質・化学療法薬剤、検査用薬剤、抗炎症剤、眼疾患薬剤、中枢神経系薬剤、自己免疫系薬剤、循環器系薬剤、糖尿病、高脂血症等の生活習慣病薬剤または経口、経肺、経皮膚もしくは経粘膜のための各種薬剤、副腎皮質ホルモン、免疫抑制剤、抗菌薬、抗ウイルス薬、血管新生抑制剤、サイトカインやケモカイン、抗サイトカイン抗体や抗ケモカイン抗体、抗サイトカイン・ケモカイン受容体抗体、siRNA、miRNA、smRNA、アンチセンス ODN や DNA などの遺伝子治療関連の核酸製剤、神経保護因子、抗体医薬からなる群から選択される57記載のリポソーム製剤。

59. 経口投与用製剤である、57または58に記載のリポソーム製剤。

60. 非経口投与用製剤である、57または58に記載のリポソーム製剤。
61. 薬剤が腫瘍用薬剤である、58に記載のリポソーム製剤を含む抗癌剤。
62. 糖鎖修飾リポソームを含む薬剤が、ドキソルビシンである61に記載のリポソーム製剤。
63. 経口投与用抗癌剤である、61または62に記載の抗癌剤。
64. 非経口投与用抗癌剤である、61または62に記載の抗癌剤。
65. 1から33のいずれかに記載の糖鎖修飾リポソームに化粧品を封入したリポソーム製剤を含む化粧品組成物。
66. 経皮投与製剤である65に記載の化粧品組成物。
67. 化粧品が、ビタミンAまたはビタミンEである65または66に記載の化粧品組成物。
68. 1から33のいずれかに記載の糖鎖修飾リポソームに食品を封入したリポソーム製剤を含む食品組成物。
69. 経口投与製剤である68に記載の食品組成物。
70. 食品が栄養補助食品である68または69に記載の食品組成物。
71. 食品が、ビタミンAまたはビタミンEである69または70に記載の食品組成物。
72. 42から56のいずれかに記載のリポソームに化粧品を封入したリポソーム製剤を含む化粧品組成物。
73. 経皮投与製剤である72に記載の化粧品組成物。
74. 化粧品が、ビタミンAまたはビタミンEである72または73に記載の化粧品組成物。
75. 42から56のいずれかに記載のリポソームに食品を封入したリポソーム製剤を含む食品組成物。
76. 経口投与製剤である75に記載の食品組成物。
77. 食品が栄養補助食品である75または76に記載の食品組成物。
78. 食品が、ビタミンAまたはビタミンEである76または77に記載の食品組成物。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2003-285432、

2004-093872 号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図 1 は、アルファ 1,2 マンノビオース二糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図 2 は、アルファ 1,3 マンノビオース二糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図 3 は、アルファ 1,4 マンノビオース二糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図 4 は、アルファ 1,6 マンノビオース二糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図 5 は、アルファ 1,3 アルファ 1,6 マンノトリオース三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図 6 は、オリゴマンノース 3 五糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図 7 は、オリゴマンノース 4 b 六糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図 8 は、オリゴマンノース 5 七糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図 9 は、オリゴマンノース 6 八糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図 10 は、オリゴマンノース 7 九糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図 11 は、オリゴマンノース 8 十糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図 12 は、オリゴマンノース 9 十一糖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図 13 は、13 種のリポソーム複合体の静脈内投与 60 分後の血中への分布量を示す図である。

図 1 4 は、13 種のリポソーム複合体の静脈内投与 60 分後の肝臓への分布量を示す図である。

図 1 5 は、13 種のリポソーム複合体の静脈内投与 60 分後の脾臓への分布量を示す図である。

図 1 6 は、13 種のリポソーム複合体の静脈内投与 60 分後の肺への分布量を示す図である。

図 1 7 は、13 種のリポソーム複合体の静脈内投与 60 分後の脳への分布量を示す図である。

図 1 8 は、13 種のリポソーム複合体の静脈内投与 60 分後の癌組織への分布量を示す図である。

図 1 9 は、13 種のリポソーム複合体の静脈内投与 60 分後のリンパ節への分布量を示す図である。

図 2 0 は、13 種のリポソーム複合体の静脈内投与 60 分後の胸腺への分布量を示す図である。

図 2 1 は、13 種のリポソーム複合体の静脈内投与 60 分後の心臓への分布量を示す図である。

図 2 2 は、13 種のリポソーム複合体の静脈内投与 60 分後の小腸への分布量を示す図である。

図 2 3 は、3'-シアリルラクトース三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図 2 4 は、6'-シアリルラクトース三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図 2 5 は、3'-シアリルラクトサミン三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図 2 6 は、6'-シアリルラクトサミン三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図 2 7 は、4 種のリポソーム複合体の腸管内投与 10 分後の血中への移行量を示す図である。

図 2 8 は、4 種のリポソーム複合体の腸管内投与 10 分後の血中への移行量を示す図である。

す図である。

図 29 は、4 種のリポソーム複合体の腸管内投与 10 分後の血中への移行量を示す図である。

図 30 は、4 種のリポソーム複合体の腸管内投与 10 分後の血中への移行量を示す図である。

図 31 は、4 種のリポソーム複合体の腸管内投与 10 分後の血中への移行量を示す図である。

図 32 は、比較試料としての tris(hydroxymethyl)aminomethane を結合したリポソームの模式図である。

図 33 は、ルイス X 型三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図 34 は、シアリルルイス X 型四糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

図 35 は、ラクトース二糖鎖により修飾されたリポソームの構造例を示す模式図である。

図 36 は、2'-フコシルラクトース三糖鎖により修飾されたリポソームの構造例を示す模式図である。

図 37 は、ジフコシルラクトース四糖鎖により修飾されたリポソームの構造例を示す模式図である。

図 38 は、3-フコシルラクトース三糖鎖により修飾されたリポソームの構造例を示す模式図である。

図 39 は、アルファ 1,6 マンノビオース二糖鎖を結合したリポソームの尾静注投与での担癌マウスにおける制癌効果を示す図である。

図 40 は、アルファ 1,6 マンノビオース二糖鎖を結合したリポソームの尾静注投与での担癌マウスにおける制癌効果を示す写真である。

図 41 は、3-フコシルラクトース三糖鎖を結合したリポソームの経口投与での担癌マウスにおける制癌効果を示す図である。

図 42 は、3-フコシルラクトース三糖鎖を結合したリポソームの経口投与での担癌マウスにおける制癌効果を示す写真である。

図 4 3 は、インターフェロン α による L-Dox と L-Dox-SLX の細胞傷害性増強試験の結果を示す図である。

図 4 4 は、L-セレクチン中和抗体による IFN 付加時 L-Dox-SLX の細胞傷害性抑制試験の結果を示す図である。

図 4 5 は、担癌マウスにおける血中のドキソルビシン濃度の経時変化を示す図である。

図 4 6 は、担癌マウスにおける腫瘍中のドキソルビシン濃度の経時変化を示す図である。

図 4 7 は、担癌目薄の腫瘍組織及び細胞へのドキソルビシンの分布を示す顕微鏡写真である。

図 4 8 は、尾静注投与での担癌マウスにおける制癌効果を示す図である。

図 4 9 は、尾静注投与での担癌マウスにおける制癌効果を示す写真である。

図 5 0 は、尾静注投与での担癌マウスにおける制癌効果を示す各投与群の腫瘍重量を示す図である。

図 5 1 は、2 種類の親水性化処理を行ったリポソームと未処理のリポソームの担癌マウス尾静注投与 5 分後の血中滞留性の比較結果を示す図である。

図 5 2 は、炎症を起こした RA マウスの四肢の写真である。

図 5 3 は、RA マウスに対するプレドニゾロン包埋 DDS 静脈投与による治療の結果を示す図である。

図 5 4 は、RA マウスに対するプレドニゾロン包埋 DDS 経口投与による治療の結果を示す図である。

図 5 5 は、RA マウスに対する適切量のプレドニゾロン投与による治療の結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

本発明は、表面に種々の糖鎖を有する標的指向性リポソームおよび腸管吸収制御性リポソームである。本発明において、標的指向性とは生体内に投与したときに特定の組織や器官または癌等の疾患部位等の標的部位に特異的に到達し取り込

まれ得る性質をいう。また、腸管吸収制御性とは、腸管経由で生体内に取り込まれる性質、すなわち腸管吸収性であって、さらに取り込まれる速度、程度等を制御し得る性質をいう。

リポソームとは、通常、膜状に集合した脂質層および内部の水層から構成される閉鎖小胞を意味する。本発明のリポソームは、図1～12、23～26および32～38に示されるように、その表面すなわち脂質層に糖鎖が、結合している、糖鎖は直接リポソームの脂質層に結合していてもよいし、ヒト血清アルブミン等のヒト由来蛋白質を含む生体蛋白質であるリンカー蛋白質を介して、共有結合していてもよい。糖鎖は、その種類と密度が制御されて結合している。

糖鎖は、本発明の腸管吸収制御性リポソームおよび本発明の標的指向性リポソームの標的組織や器官または癌などに応じて種々のものを用いることができる。

病変部の血管内皮細胞に発現するE-セレクトイン、P-セレクトインと白血球の細胞膜上に発現している糖鎖であるシアリルルイスXが強く結合することが知られている。本リポソームはこのシアリルルイスX糖鎖またはこれと同様にE-セレクトイン、P-セレクトイン等のレクチン様の糖鎖結合部位を有する蛋白質に反応することができる糖鎖が糖鎖の種類と密度が制御されて結合しているリポソームであり、血管内皮細胞がE-セレクトイン、P-セレクトイン等を発現している癌等の病巣部位に特異的に集積すると考えられる。またE-セレクトイン、P-セレクトイン等を発現している部位は炎症や血管新生が生じている部位であり、そのような部位の血管は内皮細胞の細胞間隙が拡大しており、集積したリポソームがその隙間から病巣部位およびその周囲に拡散するものと考えられる。拡散したリポソームは病巣部位およびその周囲の各種細胞に取り込まれ (endocytosis)、細胞内で内包している薬剤を放出する。このようなメカニズムで炎症性疾患または癌などに効果を発揮する。

本発明のリポソームに結合させる糖鎖として、上述のようにE-セレクトイン、P-セレクトイン等のレクチン様の糖鎖結合部位を有する蛋白質に反応することができる糖鎖が挙げられる。ここで、E-セレクトイン、P-セレクトイン等とは、セレクトイン、DC-SIGN、DC-SGMR、コレクチン、マンノース結合蛋白質等のC-タイプレクチン、シグレック等のIタイプレクチン、マンノース-6-リン酸受容体などのPタイプレ

クチン、R タイプレクチン、L タイプレクチン、M タイプレクチン、ガレクチンなどの各種のレクチン（糖鎖認識蛋白質）をいう。本発明のリポソームが標的とする細胞は、細胞により発現するレクチン様の糖鎖結合部位を有する蛋白質の種類が異なるので、該蛋白質の種類に応じて糖鎖を選択することにより特定の細胞に特異的に指向性を有するリポソームを得ることができる。

例えば、腸管吸収制御性リポソームとして、3'-シアリルラクトース三糖鎖（図 2 3 に構造式を示す。以下、同様）、6'-シアリルラクトース三糖鎖（図 2 4）、3'-シアリルラクトサミン糖鎖（図 2 5）および 6'-シアリルラクトサミン糖鎖（図 2 6）が挙げられ、標的指向性リポソームとしてアルファ 1,2 マンノビオース二糖鎖（図 1）、アルファ 1,3 マンノビオース二糖鎖（図 2）、アルファ 1,4 マンノビオース二糖鎖（図 3）、アルファ 1,6 マンノビオース二糖鎖（図 4）、アルファ 1,3 アルファ 1,6 マンノトリオース三糖鎖（図 5）、オリゴマンノース 3 五糖鎖（図 6）、オリゴマンノース 4 b 六糖鎖（図 7）、オリゴマンノース 5 七糖鎖（図 8）、オリゴマンノース 6 八糖鎖（図 9）、オリゴマンノース 7 九糖鎖（図 10）、オリゴマンノース 8 十糖鎖（図 11）、オリゴマンノース 9 十一糖鎖（図 12）、ルイス X 型三糖鎖（図 3 3）、シアリルルイス X 型四糖鎖（図 3 4）、ラクトース二糖鎖（図 3 5）、2'-フコシルラクトース三糖鎖（図 3 6）、ジフコシルラクトース四糖鎖（図 3 7）、3-フコシルラクトース三糖鎖（図 3 8）が挙げられる。

本発明に用いられるリポソームについては、膜安定性をよくすること、封入される薬物や遺伝子などのもれをなくすこと、膜面の親水性化処理をできるようにすること、蛋白質を各種密度で結合できるようにすること、糖鎖を各種密度で結合できるようにすること、などを可能にするために、鋭意努力をして、以下の様な各種の脂質と糖脂質などを構成成分とするリポソームを作製した。本発明のリポソームを構成する脂質としては、例えば、フォスファチジルコリン類、フォスファチジルエタノールアミン類、フォスファチジン酸類、長鎖アルキルリン酸塩類、ジセチルリン酸類、ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類、スフィンゴミエリン類、コレステロール類等が挙げられ、フォスファチジルコリン類としては、ジミリストイルフォスファチジルコリン、ジパルミトイルフォスファチジルコリン、ジステアロイルフォスファチジルコリン等が、

また、フォスファチジルエタノールアミン類としては、ジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルフォスファチジルエタノールアミン等が、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩類としては、ジミリストイルフォスファチジン酸、ジパルミトイルフォスファチジン酸、ジステアロイルフォスファチジン酸、ジセチルリン酸等が、ガングリオシド類としては、ガングリオシドGM1、ガングリオシドGD1a、ガングリオシドGT1b等が、糖脂質類としては、ガラクトシルセラミド、グルコシルセラミド、ラクトシルセラミド、フォスファチド、グロボシド等が、フォスファチジルグリセロール類としては、ジミリストイルフォスファチジルグリセロール、ジパルミトイルフォスファチジルグリセロール、ジステアロイルフォスファチジルグリセロール等が好ましい。このうち、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩類、ガングリオシド類もしくは糖脂質類、コレステロール類はリポソームの安定性を上昇させる効果を有するので、構成脂質として添加するのが望ましい。

例えば、本発明のリポソームを構成する脂質として、フォスファチジルコリン類（モル比0～70%）、フォスファチジルエタノールアミン類（モル比0～30%）、フォスファチジン酸類、長鎖アルキルリン酸塩およびジセチルリン酸類からなる群から選択される1種以上の脂質（モル比0～30%）、ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類およびスフィンゴミエリン類からなる群から選択される1種以上の脂質（モル比0～40%）、ならびにコレステロール類（モル比0～70%）を含むものが挙げられる。リポソーム自体は、周知の方法に従い製造することができるが、これには、薄膜法、逆層蒸発法、エタノール注入法、脱水-再水和法等を挙げることができる。

また、超音波照射法、エクストルージョン法、フレンチプレス法、ホモジナイゼーション法等を用いて、リポソームの粒子径を調節することも可能である。本発明のリポソーム自体の製法について、具体的に述べると、例えば、まず、フォスファチジルコリン類、コレステロール、フォスファチジルエタノールアミン類、フォスファチジン酸類、ガングリオシド類、糖脂質類もしくはフォスファチジルグリセロール類を配合成分とする脂質と界面活性剤コール酸ナトリウムとの混合

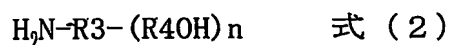
ミセルを調製する。

とりわけ、フォスファチジン酸類もしくはジセチルホスフェート等の長鎖アルキルリン酸塩類の配合は、リポソームを負に荷電させるために必須であり、フォスファチジルエタノールアミン類の配合は親水性化反応部位として、ガングリオシド類または糖脂質類またはフォスファチジルグリセロール類の配合はリンカー蛋白質の結合部位として必須のものである。ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類、スフィンゴミエリン類およびコレステロール類からなる群から選択される少なくとも1種の脂質はリポソーム中で集合し、リンカー蛋白質を結合させる足場（ラフト）として機能する。本発明のリポソームは、このような蛋白質を結合させうるラフトが形成されることによりさらに安定化される。すなわち、本発明のリポソームは、リンカー蛋白質を結合させるためのガングリオシド、糖脂質、フォスファチジルグリセロール類、スフィンゴミエリン類およびコレステロール類からなる群から選択される少なくとも1種の脂質のラフトが形成されたリポソームを含む。

そして、これにより得られる混合ミセルの限外濾過を行うことによりリポソームを作製する。

本発明において使用するリポソームは、通常のもので使用できるが、その表面は親水性化されていることが望ましい。上述のようにしてリポソームを作製した後にリポソーム表面を親水性化する。リポソーム表面の親水性化は、リポソーム表面に親水性化合物を結合させることにより行う。親水性化に用いる化合物としては、低分子の親水性化合物、好ましくは少なくとも1つのOH基を有する低分子の親水性化合物、さらに好ましくは、少なくとも2つのOH基を有する低分子の親水性化合物が挙げられる。また、さらに少なくとも1つのアミノ基を有する低分子の親水性化合物、すなわち分子中に少なくとも1つのOH基と少なくとも1つのアミノ基を有する親水性化合物が挙げられる。親水性化合物は、低分子なので、糖鎖に対する立体障害となりにくく標的細胞膜面上のレクチンによる糖鎖分子認識反応の進行を妨げることはない。また、親水性化合物には、本発明の糖鎖修飾リポソームにおいて、レクチン等の特定の標的を指向するために用いられるレクチンが結合し得る糖鎖は含まれない。このような親水性化合物として、例えば、

トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンなどを含むトリス（ヒドロキシアルキル）アミノアルカン等のアミノアルコール類等が挙げられ、さらに具体的には、トリス（ヒドロキシメチル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノエタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノメタン、トリス（ヒドロキシメチル）アミノプロパン、トリス（ヒドロキシエチル）アミノプロパン、トリス（ヒドロキシプロピル）アミノプロパン等が挙げられる。さらに、OH基を有する低分子化合物にアミノ基を導入した化合物も本発明の親水性化合物として用いることができる。該化合物は限定されないが、例えば、セロビオース等のレクチンが結合しない糖鎖にアミノ基を導入した化合物が挙げられる。例えば、リポソーム膜の脂質フォスファチジルエタノールアミン上に架橋用の二価試薬とトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンとを用いてリポソーム表面を親水性化する。親水性化合物の一般式は、下記式（１）、式（２）、式（３）等で示される。



ここで、R1、R3およびR5は、C1からC40、好ましくはC1からC20、さらに好ましくはC1からC10の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R2、R4は存在しないかもしくはC1からC40、好ましくはC1からC20、さらに好ましくはC1からC10の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示す。Xはリポソーム脂質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、例えば、COOH、NH、NH₂、CHO、SH、NHS-エステル、マレイミド、イミドエステル、活性ハロゲン、EDC、ピリジルスルフィド、アジドフェニル、ヒドラジド等が挙げられる。nは自然数を示す。

このような親水性化合物で親水性化を行ったリポソームの表面は、薄く親水性化合物で覆われている。但し、その親水性化合物の覆いの厚みは小さいので、リポソームに糖鎖を結合させた場合であっても、糖鎖等の反応性を抑制することはない。

リポソームの親水性化は、従来公知の方法、例えば、ポリエチレングリコール、

ポリビニルアルコール、無水マレイン酸共重合体等を共有結合により結合させたリン脂質を用いてリポソームを作成する方法（特開 2000-302685 号）等の方法を採用することによっても行うことができる。

このうち、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを用いてリポソーム表面を親水性化することが特に好ましい。

本発明のトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを用いる手法は、ポリエチレングリコールなどを用いる従来の親水性化方法と比較していくつかの点で好ましい。例えば、本発明のように糖鎖をリポソーム上に結合してその分子認識機能を標的指向性を利用するものでは、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンは低分子量物質であるので従来のポリエチレングリコールなどの高分子量物質を用いる方法に比べて、糖鎖に対する立体障害となりにくく標的細胞膜面上のレクチン（糖鎖認識蛋白質）による糖鎖分子認識反応の進行を妨げないので特に好ましい。

また、本発明によるリポソームは該親水化処理後においても粒径分布や成分組成、分散特性が良好であり、長時間の保存性や生体内安定性も優れているのでリポソーム製剤化して利用するために好ましい。

トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを用いてリポソーム表面を親水性化するには、例えばジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルフォスファチジルエタノールアミン等の脂質を用いて、常法により得たリポソーム溶液にビススルフォキシニミチルスベラート、ジスクシニミチルグルタレート、ジチオビススクシニミチルプロピオネート、ジスクシニミチルスベラート、3,3'-ジチオビススルフォキシニミチルプロピオネート、エチレングリコールビススクシニミチルスクシネート、エチレングリコールビススルフォキシニミチルスクシネート等の 2 価試薬を加えて反応させることにより、リポソーム膜上のジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン等の脂質に 2 価試薬を結合させ、次いでトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを、該 2 価試薬の一方の結合手と反応させることにより、リポソーム表面にトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを結合せしめる。

このように、リポソームを親水性化処理したリポソームは、生体内で極めて安定であり、後述のように標的指向性を有する糖鎖を結合しなくても、生体内での半減期が長いことためドラッグデリバリーシステムにおけるドラッグ担体として好適に用いることができる。本発明は、表面を低分子化合物で親水性化したリポソームをも包含する。

本発明は、上記の親水性化化合物を用いて親水性化した糖鎖の結合していないリポソームそのものをも包含する。このような親水性化したリポソームは、リポソーム自体の安定性が高まり、また糖鎖を結合したときに糖鎖の認識性が高まるという利点がある。

本発明のリポソームは、例えば、リポソームの構成脂質が、フォスファチジルコリン類（モル比 0～70%）、フォスファチジルエタノールアミン類（モル比 0～30%）、フォスファチジン酸類、長鎖アルキルリン酸塩およびジセチルリン酸類からなる群から選択される 1 種以上の脂質（モル比 0～30%）、ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類およびスフィンゴミエリン類からなる群から選択される 1 種以上の脂質（モル比 0～40%）、ならびにコレステロール類（モル比 0～70%）を含む、リポソームである。

本発明は、さらにリポソームに上記に親水性化化合物を結合させて、リポソームを親水性化する方法をも包含する。また、糖鎖の結合していない親水性化したリポソームをも包含する。糖鎖の結合していないリポソームに糖鎖を結合することにより、本発明の標的指向性リポソームまたは腸管吸収性リポソームを製造することができる。

本発明においては、上記のようにして作製したリポソームに、上記の糖鎖のいずれかを直接結合させてもよいし、さらに、糖鎖をリンカー蛋白質を介して結合させてもよい。この際、リポソームに結合させる糖鎖の種類は 1 種類に限らず、複数の糖鎖を結合させてもよい。この場合の複数の糖鎖は同じ組織または器官の細胞表面に共通して存在する異なるレクチンに対して結合活性を有する複数の糖鎖であってもよいし、異なる組織または器官の細胞表面に存在する異なるレクチンに対して結合活性を有する糖鎖であってもよい。前者のような複数の糖鎖を選択することにより、特定の標的組織または器官を確実に指向することができ、後

者のような複数の糖鎖を選択することにより、1種類のリポソームに複数の標的を指向させることができ、マルチパーパスな標的指向性リポソームを得ることができる。

なお、糖鎖をリポソームに結合させるには、リポソームの製造時にリンカー蛋白質および／または糖鎖を混合し、リポソームを製造させつつ糖鎖をその表面に結合させることも可能であるが、あらかじめリポソーム、リンカー蛋白質および糖鎖を別途準備し、製造が完了したリポソームにリンカー蛋白質および／または糖鎖を結合させたほうが望ましい。これは、リポソームにリンカー蛋白質および／または糖鎖を結合させることにより、結合させる糖鎖の密度を制御できるからである。

糖鎖のリポソームへの直接結合は、以下に述べるような方法で行うことができる。

糖鎖を糖脂質として混合してリポソームを製造するか、製造後のリポソームのリン脂質に糖鎖を結合するとともに糖鎖密度を制御する。

リンカー蛋白質を用いて糖鎖を結合させる場合、リンカー蛋白質としては、生体由来の蛋白質、特にヒト由来蛋白質を用いるのが好ましい。生体由来の蛋白質は限定されないが、アルブミン等の血液中に存在する蛋白質、その他生体に存在する生理活性物質等が挙げられる。例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、ウシ血清アルブミン（BSA）等の動物の血清アルブミンが挙げられるが、特にヒト血清アルブミンを使用する場合は、各組織に対する取り込みが多いことがマウスについての実験により確かめられている。

本発明のリポソームは、非常に安定であり、リポソームを形成した後に蛋白質を結合させたり、リンカー蛋白質を結合させたり、糖鎖を結合させるという後処理が可能である。従って、リポソームを大量に製造した後に、目的に応じてそれぞれ異なる蛋白質を結合させたり、リンカー蛋白質や糖鎖を結合させることにより、目的に応じた種々のリポソームを製造することが可能である。

本発明のリポソームには、糖鎖がリンカー蛋白質を介して、あるいはリポソームを構成する脂質に直接結合している。本発明のリポソームは、糖脂質や糖タンパク質等の複合糖質型リガンドを有し、低分子化合物で親水化处理されているリ

ポソームである。

また、後述のように、本発明の標的指向性リポソームを医薬として用いる場合、該リポソームは医薬効果を有する化合物を含んでいる必要がある。該医薬効果を有する化合物は、リポソーム中に封入させるか、あるいはリポソーム表面に結合させればよいが、リンカー蛋白質として、医薬効果を有する蛋白質を用いてもよい。この場合、蛋白質がリポソームと糖鎖を結合させるためのリンカー蛋白質および医薬効果を有する蛋白質を兼ねることもある。薬効を有する蛋白質としては、生理活性蛋白質等が挙げられる。

糖鎖をリンカー蛋白質を介してリポソームへ結合させるには以下に述べる方法で行えばよい。

まずリポソーム表面に蛋白質を結合させる。リポソームを、 NaIO_4 、 $\text{Pb}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4$ 、 NaBiO_3 等の酸化剤で処理して、リポソーム膜面に存在するガングリオシドを酸化し、次いで、 NaBH_3CN 、 NaBH_4 等の試薬を用いて、リンカー蛋白質とリポソーム膜面上のガングリオシドを、還元的アミノ化反応により結合させる。このリンカー蛋白質も、親水性化するのが好ましく、これにはリンカー蛋白質にヒドロキシ基を有する化合物を結合させるが、例えば、ビススルホスクシニミチルスベラート、ジスクシニミチルグルタレート、ジチオビススクシニミチルプロピオネート、ジスクシニミチルスベラート、3,3'-ジチオビススルホスクシニミチルプロピオネート、エチレングリコールビススクシニミチルスクシネート、エチレングリコールビススルホスクシニミチルスクシネート等の2価試薬を用いて、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン等の上述の親水性化に用いる化合物をリポソーム上のリンカー蛋白質と結合させればよい。

これを具体的に述べると、まず、リンカー蛋白質の全てのアミノ基に架橋用2価試薬の一端を結合する。そして、各種糖鎖の還元末端をグリコシルアミノ化反応して得られる糖鎖グリコシルアミン化合物を調製し、この糖鎖のアミノ基とリポソーム上の上記で結合された架橋2価試薬の一部分の他の未反応末端とを結合する。

糖鎖および／または親水性化合物とリポソームとの共有結合、または糖鎖および／または親水性化合物とリンカー蛋白質との共有結合は、リポソームが細胞内

に取り込まれたときに切断することも可能である。例えば、リンカー蛋白質と糖鎖がジスルフィド結合を介して共有結合されている場合、細胞内で還元されて糖鎖が切断される。糖鎖が切断されることによりリポソーム表面が疎水性になり、生体膜と結合し膜安定性が乱れリポソーム中に含まれる薬剤が放出される。

次に、このようにして得られる糖鎖結合リポソーム膜面上蛋白質の表面に糖鎖が結合していない未反応で残っている大部分の2価試薬未反応末端を用いて親水性化処理を行う。つまり、このリポソーム上蛋白質に結合している2価試薬の未反応末端とトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン等の上述の親水性化に用いる化合物との結合反応を行い、リポソーム表面全体を親水性化する。

リポソーム表面およびリンカー蛋白質の親水性化は、各種組織への移行性、および血中における滞留性および各種組織への移行性を向上させる。これは、リポソーム表面およびリンカー蛋白質表面が親水性化されることによって、糖鎖以外の部分が、各組織等においてはあたかも生体内水分であるかのように見え、これにより、標的以外の組織等に認識されず、糖鎖のみがその標的組織のレクチン（糖鎖認識蛋白質）により認識されることに起因するものと思われる。

次いで、糖鎖をリポソーム上のリンカー蛋白質に結合させる。これには、糖鎖を構成する糖類の還元末端を、 NH_4HCO_3 、 $\text{NH}_2\text{COONH}_4$ 等のアンモニウム塩を用いてグリコシルアミノ化し、次いで、ビススルフォスクシニミチルスベレート、ジスクシニミチルグルタレート、ジチオビススクシニミチルプロピオネート、ジスクシニミチルスベレート、3,3'-ジチオビススルフォスクシニミチルプロピオネート、エチレングリコールビススクシニミチルスクシネート、エチレングリコールビススルフォスクシニミチルスクシネート等の2価試薬を用いて、リポソーム膜面上に結合したリンカー蛋白質と、上記グリコシルアミノ化された糖類とを結合させ、図1～12、23～26および33～38に示されるようなリポソームを得る。なお、これらの糖鎖は市販されている。

本発明のリポソーム、糖鎖等結合リポソームの粒径は、30～500nm、好ましくは50～350nmである。また、本発明のリポソームは、負に荷電していることが望ましい。負に荷電していることにより、生体中の負に荷電している細胞との相互作用を防ぐことができる。本発明のリポソーム表面のゼータ電位は、生理食塩水中

において、37℃で、-50～10mV、好ましくは-40～0mV、さらに好ましくは-30～-10mVである。

さらに、糖鎖を結合させた場合の糖鎖の結合密度は、リポソームに結合させるリンカー蛋白質1分子当たり1～60個、好ましくは1～40個、さらに好ましくは1～20個である。また、リポソーム1粒子当りは、リンカー蛋白質を用いる場合は、1～30000個、好ましくは1～20000個、さらに好ましくは1～10000個、あるいは100～30000個、好ましくは100～20000個、さらに好ましくは100～10000個、あるいは500～30000個、好ましくは500～20000個、さらに好ましくは500～10000個である。リンカー蛋白質を用いない場合は、リポソーム1粒子当たり最高1～500000個、好ましくは1～300000個、さらに好ましくは1～100000個以上の糖鎖を結合させることができる。

本発明においては、使用する糖鎖の構造と糖鎖結合量を種々選択することにより、各標的細胞、組織に対する指向性を制御することができる。

また、糖鎖の種類と糖鎖結合量によっては腸管での吸収制御性を高めることもできる。腸管吸収制御性を高める糖鎖と特定の組織または器官への指向性を有する糖鎖の両方をリポソームに結合させることにより、特定組織または器官への指向性と腸管吸収制御性の両方の特性を併せ持ったリポソームを作製することができる。

上述のように、本発明の標的指向性リポソームは糖鎖の種類と糖鎖結合量により特異的に結合するレクチンが決まり、特定の組織または器官に特異的に到達する。また、糖鎖構造と糖鎖結合量を選択することにより癌組織等の疾患部位に到達させることも可能である。

本発明においては、使用する糖鎖の構造と糖鎖結合量を種々選択することにより、各標的細胞、組織に対する指向性を制御することができる。本発明のリポソームは、糖鎖により血中、肝臓、脾臓、肺、脳、小腸、心臓、胸腺、腎臓、膵臓、筋肉、大腸、骨、骨髄、癌組織、炎症組織およびリンパ節等の組織または器官を指向する。例えば、実施例における図13、16、17、18、21および22が示すように、アルファ1,2マンノピオース二糖鎖、アルファ1,3マンノピオース二糖鎖、アルファ1,4マンノピオース二糖鎖、アルファ1,6マンノピオース二

糖鎖、アルファ 1,3 アルファ 1,6 マンノトリオース三糖鎖、オリゴマンノース 3 五糖鎖、オリゴマンノース 4 b 六糖鎖、オリゴマンノース 5 七糖鎖、オリゴマンノース 6 八糖鎖、オリゴマンノース 7 九糖鎖、オリゴマンノース 8 十糖鎖およびオリゴマンノース 9 十一糖鎖を結合したリポソームはすべて血中、肺、脳、癌組織、心臓および小腸への指向性が高い。また、図 1 4 が示すように、アルファ 1,2 マンノビオース二糖鎖、オリゴマンノース 3 五糖鎖、オリゴマンノース 4 b 六糖鎖を結合したリポソームは肝臓への指向性が高い。また、図 1 5 が示すようにアルファ 1,2 マンノビオース二糖鎖、アルファ 1,3 マンノビオース二糖鎖、アルファ 1,3 アルファ 1,6 マンノトリオース三糖鎖を結合したリポソームは脾臓への指向性が高い。また、図 1 9 が示すようにアルファ 1,2 マンノビオース二糖鎖、アルファ 1,4 マンノビオース二糖鎖、アルファ 1,6 マンノビオース二糖鎖を結合したリポソームはリンパ節への指向性が高い。さらに、オリゴマンノース 6 八糖鎖を結合したリポソームは胸腺への指向性が高い。

また、本発明の図 2 3 ~ 2 6 に示されるリポソームは、全般的に腸管吸収性は極めて高いものの、さらに、リポソーム上の糖鎖の密度の調節を行うことにより、腸管吸収性を制御し、より効率的に標的部位へ薬剤を移行させることが可能となり、副作用の軽減化を図ることができる。例えば、実施例における図 2 7 ~ 3 0 においては、上記 4 種の糖鎖修飾リポソームにおける糖鎖結合量を 3 段階に変更した場合における、腸管から血中への移行性（すなわち腸管吸収性）を示す。

なお、この糖鎖結合量の変更は、リンカー蛋白質結合リポソームに対して糖鎖を 3 段階の濃度で (1) 50 μ g、2) 200 μ g、3) 1mg) で結合せしめることにより行ったものである。これによれば、6'-シアリルラクトース三糖鎖、6'-シアリルラクトサミン糖鎖の場合、糖鎖密度を高くするにつれ、腸管吸収性が順次低下するが、3'-シアリルラクトース三糖鎖、3'-シアリルラクトサミン糖鎖の場合は腸管吸収性が逆に上昇する。これらのことは、腸管吸収性は、リポソーム上の糖鎖の結合量により、糖鎖の種類毎に異なることを示す。したがって、糖鎖の種類毎にリポソーム上の糖鎖結合量を適宜設定することにより、腸管吸収性を制御することが可能となる。

本発明のリポソームに、医薬効果を有する化合物を含ませることにより、特定

の組織または器官にリポソームが到達し、その組織または器官の細胞にリポソームが取り込まれ、医薬効果を有する化合物を放出し、医薬効果を奏する。糖鎖結合リポソームの場合は、糖鎖の有する標的指向性により特定の組織または器官にリポソームが到達する。また、糖鎖が結合していない場合であっても、リポソームは体内で非常に安定なため体内での半減期が長くなり、特定の組織または器官に到達し得る。

医薬効果を有する化合物は限定されず、公知の蛋白質、公知の医薬化合物を広く用いることが可能である。抗癌剤等の特定の疾患に対する医薬化合物等を含ませることにより、本発明のリポソームを特定の疾患の治療薬として用いることができる。さらに、本発明のリポソームに含める医薬効果を有する化合物としては、遺伝子治療用 DNA、RNA、siRNA 等が挙げられる。

本発明のリポソームに含ませる医薬化合物としては、アルキル化系抗癌剤、代謝拮抗剤、植物由来抗癌剤、抗癌性抗生物質、BRM・サイトカイン類、白金錯体系抗癌剤、免疫療法剤、ホルモン系抗癌剤、モノクローナル抗体等の腫瘍用薬剤、中枢神経用薬剤、末梢神経系・感覚器官用薬剤、呼吸器疾患治療薬剤、循環器用薬剤、消化器官用薬剤、ホルモン系用薬剤、泌尿器・生殖器用薬剤、外用薬剤、ビタミン・滋養強壮剤、血液・体液用薬剤、代謝性医薬品、抗生物質・化学療法薬剤、検査用薬剤、抗炎症剤、眼疾患薬剤、中枢神経系薬剤、自己免疫系薬剤、循環器系薬剤、糖尿病。高脂血症等の生活習慣病薬剤または経口、経肺、経皮膚もしくは経粘膜のための各種薬剤、副腎皮質ホルモン、免疫抑制剤、抗菌薬、抗ウイルス薬、血管新生抑制剤、サイトカインやケモカイン、抗サイトカイン抗体や抗ケモカイン抗体、抗サイトカイン・ケモカイン受容体抗体、siRNA、miRNA、smRNA、アンチセンス ODN や DNA などの遺伝子治療関連の核酸製剤、神経保護因子、種々の抗体医薬等が挙げられる。

例えば、腫瘍用薬剤として、塩酸ナイトロジェンマスタード-N-オキシド、シクロホスファミド、イホスファミド、ブルスファン、塩酸ニムスチン、ミトブロニトール、メルファラン、ダカルバジン、ラニムスチン、リン酸エストラムスチンナトリウムなどのアルキル化剤、メルカプトプリン、チオイノシン（メルカプトプリンリボシド）、メトトレキサート、エノシタビン、シタラビン、塩酸アンシ

タビン（塩酸サイクロシチジン）、フルオロウラシル、5-FU、テガフル、ドキシフルリジン、カルモフルなどの代謝拮抗剤、エトポシド、硫酸ビンブラスチン、硫酸ビンクリスチン、硫酸ビンデシン、パクリタキセル、タキソール、塩酸イリノテカン、塩酸ノギテカンなどのアルカロイド等の植物由来抗癌剤、アクチノマイシンD、マイトマイシンC、クロモマイシンA3、塩酸ブレオマイシン、硫酸ブレオマイシン、硫酸ペプロマイシン、塩酸ダウノルビシン、塩酸ドキソルビシン、塩酸アクリラルビシン（アクリシノマイシンA）、塩酸ピラルビシン、塩酸エピルビシン、ネオカルチノスタチンなどの抗癌性抗生物質、その他、塩酸ミトキサントロン、カルボプラチン、シスプラチン、L-アスパラギナーゼ、アセグラトン、塩酸プロカルバジン、クエン酸タモキシフェン、ウベニメクス、レンチナン、シゾフィラン、酢酸メドロキシプロゲステロン、ホスフェストロール、メピチオスタン、エピチオスタノール等がある。本発明において、上述の薬剤にはその誘導体も包含される。

上述のような薬剤を含ませることにより、本発明のリポソームを、癌、炎症等の疾患の治療に用いることができる。ここで、癌は、腫瘍や白血病等のあらゆる新生物による疾患を含む。本発明の糖鎖修飾リポソームにこれらの薬剤を含ませて投与した場合、薬剤を単独で投与した場合に比較し、薬剤が癌、炎症部位に集積する。単独投与の場合に比べ、2倍以上、好ましくは5倍以上、さらに好ましくは10倍以上、特に好ましくは50倍以上集積し得る。

なお、医薬効果を有する化合物は、リポソームの中に封入させてもよいし、リポソーム表面に結合させてもよい。例えば、蛋白質は上記のリンカー蛋白質の結合方法と同じ方法で表面に結合させることが可能であり、他の化合物もその化合物が有する官能基を利用することにより、公知の方法で、結合させることができる。また、リポソーム内部への封入は、以下の方法により行う。リポソームへ薬剤等を封入するには、周知の方法を用いればよく、例えば、薬剤等の含有溶液とフォスファチジルコリン類、フォスファチジリエタノールアミン類、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩類、ガングリオシド類、糖脂質類もしくはフォスファチジルグリセロール類およびコレステロール類を含む脂質を用いてリポソームを形成することにより、薬剤等はリポソーム内に封入される。

したがって、本発明のリポソームに、治療あるいは診断に供しうる薬剤あるいは遺伝子を封入することによって得られるリポソーム製剤は、ガン組織、炎症組織、各種組織への移行性が選択的に制御されたものであり、治療薬剤あるいは診断剤の標的細胞、組織への集中による効力の増強あるいは他の細胞、組織に対する薬剤の取り込みの減少による副作用の軽減化等を図れるものである。

本発明のリポソームまたは糖鎖修飾リポソームは、医薬組成物として、種々の形態で投与することができる。このような投与形態としては、点眼剤等による点眼投与、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、あるいは注射剤、点滴剤、座薬などによる非経口投与を挙げることができる。かかる組成物は、公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤、賦形剤を含む。たとえば、錠剤用の担体、賦形剤としては、ゲル化剤、乳糖、ステアリン酸マグネシウムなどが使用される。注射剤は、本発明の糖鎖結合リポソームを通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが使用され、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール、プロピレングリコールなどのポリアルコール、非イオン界面活性剤などと併用しても良い。油性液としては、ゴマ油、大豆油などが使用され、溶解補助剤としては安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用しても良い。

本発明の医薬組成物の投与経路は、限定されず、点眼、経口投与、静脈注射、筋肉注射等がある。投与量は、疾患の重篤度等により適宜決定できるが、本発明の組成物の医薬的に有効量を患者に投与する。ここで、「医薬的に有効量を投与する」とは、各種疾患を治療するのに適切なレベルの薬剤を患者に投与することをいう。本発明の医薬組成物の投与回数は適宜患者の症状に応じて選択される。

表面に糖鎖を有するリポソームは、非経口投与（静注投与）および経口投与に適し、投与量は、標的指向性を有さない従来のリポソーム製剤に対して、数分の1から数千分の1でよい。例えば、体重1kg当り、リポソームに含ませる薬剤の量で0.0001～1000mg、好ましくは、0.0001～10mg、さらに好ましくは、0.0001～0.1mgでよい。また、本発明のリポソームは、標的指向性を有する糖鎖を含まず

親水性化合物を結合させたリポソームも含むが、該リポソームの場合も親水性処理により生体内での安定性が高く、半減期も長いので、低用量で十分な効果を有する。

また、本発明の医薬組成物を診断用に用いる場合は、リポソームに蛍光色素、放射性化合物等の標識化合物を結合させる。該標識化合物結合リポソームが患部に結合し、標識化合物が患部細胞に取り込まれ、該標識化合物の存在を指標に疾患を検出・診断することができる。

さらに、本発明のリポソームに化粧品または香粧品を封入または結合させたものを化粧用組成物として用いることができる。ここで、化粧品とは、一般的に「人の身体を清潔にし、美化し、魅力を増し、容貌を変え、または皮膚もしくは毛髪をすこやかに保つために身体に塗擦、散布その他これらに類似する方法で使用されることが目的とされている物で、人体に対する作用が緩和なもの」をいう。本発明において「化粧品」という場合、上記の一般的な化粧品の他、「作用が緩和であり、疾病の治療または予防に使用せず、身体の構造、機能に影響を及ぼすような使用目的を併せもたないもの」と定義される医薬部外品も含む。化粧品には例えば、皮膚等の細胞に作用し、細胞を活性化させるもの等が含まれる。

化粧品としては、皮膚用、毛髪・頭髮・頭皮用化粧品を含む。

具体的には、リン酸-アスコルビン酸マグネシウム、コウジ酸、プランセンタキス、アルブチン、エラグ酸等の皮膚漂白剤（美白剤）、ビタミンA、ビタミンB、ビタミンC、ビタミンE等のビタミン類、エストロゲン、エストラジオール、エストロン、エチニルエストラジオール、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン等のホルモン類、クエン酸、酒石酸、乳酸、塩化アルミニウム、硫酸アルミニウム・カリウム、ミョウバン、アラントリンクロルヒドロキシアルミニウム、アラントインジヒドロキシアルミニウム、パラフェノールスルホン酸亜鉛、硫酸亜鉛等の皮膚収斂剤、カンタリスチンキ、トウガラシチンキ、ショウキョウチンキ、センブリエキス、ニンニクエキス、ヒノキチオール、塩化カルプロニウム、ペンタデカン酸グリセリド等の発毛促進剤、エラスチン、コラーゲン、カモミラエキス、カンゾウエキス、 β -グリチルレチン酸、グリチルリチン酸、 γ -オリザノール、パントテン酸カルシウム、パントテニルエチルエーテル、

アミノ酸等が化粧品として用い得る。その他、インターフェロン、インターロイキン、リゾチーム、ラクトフェリン、トランスフェリンなどの生理活性タンパク質等の細胞を活性化し得る化合物も化粧品として用い得る。

その他、例えば新化粧品学 第2版 光井武夫編 南山堂 2002年1月18日刊行、化粧品科学 -理論と実際- 第4版 田村健夫 廣田 博、著 フレグランスジャーナル社 2001年6月30日刊行 等に記載の化粧品を用いることができる。

本発明のリポソームに化粧品を封入または結合させた組成物は、皮膚表面に留まり、そこでリポソームに含まれる化粧品が放出され皮膚表面で効果を発揮する。また、リポソームごと経皮吸収され、角質層または角質層の下組織に到達し、その組織の細胞にリポソームが取り込まれ、化粧品を放出し、医薬効果を奏する。

化粧用組成物に用いるリポソームは糖鎖が結合していなくてもよく、この場合リポソームは皮膚または皮膚下部の組織中に留まりそこで化粧品を放出する。また皮膚の炎症部を標的として炎症部に特異的に集積し得るよう糖鎖が結合していてもよい。

本発明の化粧組成物は、上記リポソームに加えて、通常化粧料として配合される水性成分、油性成分等を含んでいてもよい。水性成分としては、例えば保湿剤、増粘剤、アルコール等が挙げられ、保湿剤としてはグリセリン、プロピレングリコール、多価アルコール等が挙げられ、増粘剤としては、トラガントガム、ペクチン、アルギン酸塩等が挙げられ、アルコールとしては、エタノール、イソプロパノール等が挙げられる。油性成分としてオリーブ油、ツバキ油、ヒマシ油、ロウ、オレイン酸、固形パラフィン、セレシン、ワックス、ワセリン、流動パラフィン、シリコンオイル、合成エステル油、合成ポリエーテル等が挙げられる。

さらに、本発明のリポソームに機能性食品、栄養補助食品または健康補助食品を封入または結合させたものを食品組成物として用いることができる。本発明で用い得る機能性食品、栄養補助食品または健康補助食品に限定はなく、摂取されて食品機能を有効に発現するように設計され、加工変換された食品ならびいずれのものも含まれる。

例えば、イチョウ葉、エキナシア、ノコギリヤシ、セントジョーンズワート、

バレリアン、ブラックコホッシュ、ミルクシスル、月見草、ブドウ種子エキス、ビルベリー、ナツシロギク、当帰、大豆、フランス海岸松、ガーリック、高麗ニンジン、茶、ショウガ、アガリクス、メシマコブ、紫イペ、AHCC、酵母ベータグルカン、マイタケ、プロポリス、ビール酵母、穀類、梅、クロレラ、大麦若葉、青汁、ビタミン類、コラーゲン、グルコサミン、桑葉、ルイボス茶、アミノ酸、ローヤルゼリー、シイタケ菌糸体エキス、スピルリナ、田七ニンジン、クレソン、植物発酵食品、DHA、EPA、ARA、昆布、キャベツ、アロエ、メグスリノ木、ホップ、カキ肉エキス、ピクジエノール、ゴマ等が本発明に用い得る機能性食品、栄養補助食品または健康補助食品として例示できる。これらは、そのままリポソームに含ませてもよいし、抽出物等の処理物を含ませてもよい。リポソームを含む食品組成物は、経口摂取される。用いるリポソームは、糖鎖が結合していなくてもよく、また腸管吸収を高める糖鎖または特定の組織もしくは器官を標的とした糖鎖が結合していてもよい。本発明のリポソームを食品組成物として投与する場合は、液体飲料、ゲル状食品、固形食品等の食品に加工すればよい。また、錠剤、顆粒等に加工してもよい。本発明の食品組成物は、リポソームが含む食品の種類に応じた機能性食品、栄養補助食品または健康補助食品として用いることができる。例えば、DHA を含むリポソームは、軽度老人性痴呆症や記憶改善に効果のある機能性食品、栄養補助食品または健康補助食品として用いることができる。

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

実施例 1 リポソームの調製

リポソームは既報の手法 (Yamazaki, N., Kodama, M. and Gabius, H.-J. (1994) Methods Enzymol. 242, 56-65) により、改良型コール酸透析法を用いて調製した。すなわち、ジパルミトイルフォスファチジルコリン、コレステロール、ジセチルフォスフェート、ガングリオシド及びジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンをモル比でそれぞれ 35 : 40 : 5 : 15 : 5 の割合の合計脂質量 45.6mg にコール酸ナトリウムを 46.9mg 添加し、クロロホルム/メタノール溶液 3ml に溶解した。この溶液を蒸発させ、沈殿物を真空中で乾燥させることによって脂質膜を得た。得られた脂質膜を TAPS 緩衝液 (pH 8.4) 3ml に懸濁、超音波処理して、透明

なミセル懸濁液を得た。さらに、ミセル懸濁液を PM10 膜 (Amicon Co., USA) と PBS 緩衝液 (pH 7.2) を用いた限外濾過にかけ均一リポソーム (平均粒径 100nm) 10ml を調製した。

実施例 2 リポソーム脂質膜面上の親水性化処理

実施例 1 で調製したリポソーム溶液 10ml を XM300 膜 (Amicon Co., USA) と CBS 緩衝液 (pH 8.5) を用いた限外濾過にかけ溶液の pH を 8.5 にした。次に、架橋試薬 bis(sulfosuccinimidyl) suberate (BS3; Pierce Co., USA) 10ml を加え、25℃で 2 時間攪拌した。その後、更に 7℃で一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンと BS3 との化学結合反応を完結した。そして、このリポソーム液を XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過にかけた。次に、CBS 緩衝液 (pH 8.5) 1ml に溶かした tris(hydroxymethyl) aminomethane 40mg をリポソーム液 10ml に加えて、25℃で 2 時間攪拌後、7℃で一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質に結合した BS3 と tris(hydroxymethyl) aminomethane との化学結合反応を完結した。これにより、リポソーム膜の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン上に tris(hydroxymethyl) aminomethane の水酸基が配位して水和親水性化された。

実施例 3 リポソーム膜面上へのヒト血清アルブミン (HSA) の結合

既報の手法 (Yamazaki, N., Kodama, M. and Gabius, H.-J. (1994) Methods Enzymol. 242, 56-65) により、カップリング反応法を用いて行った。すなわち、この反応は 2 段階化学反応で行い、まずはじめに、実施例 2 で得られた 10ml のリポソーム膜面上に存在するガングリオシドを 1ml の TAPS 緩衝液 (pH 8.4) に溶かしたメタ過ヨウ素酸ナトリウム 43mg を加えて室温で 2 時間攪拌して過ヨウ素酸酸化した後、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 8.0) で限外濾過することにより酸化されたリポソーム 10ml を得た。このリポソーム液に、20mg のヒト血清アルブミン (HSA) を加えて 25℃で 2 時間攪拌し、次に PBS (pH 8.0) に 2M NaBH₃CN 100 μ l を加えて 10℃で一晩攪拌してリポソーム上のガングリオシドと HSA とのカップリング反応で HSA を結合した。そして、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過をした後、HSA 結合リポソーム液 10ml を得た。

実施例 4 リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上へのアルファ 1,2

マンノビオース二糖鎖の結合

アルファ 1,2 マンノビオース二糖鎖 (Calbiochem Co., USA) 50 μ g を 0.25g の NH_4HCO_3 を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37°C で 3 日間攪拌した後、0.45 μ m のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してアルファ 1,2 マンノビオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を得た。次に、実施例 3 で得たリポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°C で 2 時間、続いて 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記のアルファ 1,2 マンノビオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を加えて、25°C で 2 時間攪拌し、その後 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にアルファ 1,2 マンノビオース二糖鎖の結合を行った。その結果、図 1 で示されるアルファ 1,2 マンノビオース二糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム (略称: A2) 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g、平均粒径 100nm) が得られた。

実施例 5 リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上へのアルファ 1,3 マンノビオース二糖鎖の結合

アルファ 1,3 マンノビオース二糖鎖 (Calbiochem Co., USA) 50 μ g を 0.25g の NH_4HCO_3 を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37°C で 3 日間攪拌した後、0.45 μ m のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してアルファ 1,3 マンノビオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を得た。次に、実施例 3 で得たリポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°C で 2 時間、続いて 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記のアルファ 1,3 マンノビオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を加えて、25°C で 2 時間攪拌し、その後 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にアルファ 1,3 マン

ノビオース二糖鎖の結合を行った。その結果、図2で示されるアルファ 1,3 マンノビオース二糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム（略称：A3） 2ml（総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g、平均粒径 100nm）が得られた。

実施例6 リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン（HSA）上へのアルファ 1,4 マンノビオース二糖鎖の結合

アルファ 1,4 マンノビオース二糖鎖 (Calbiochem Co., USA) 50 μ g を 0.25g の NH_4HCO_3 を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37°C で 3 日間攪拌した後、0.45 μ m のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してアルファ 1,4 マンノビオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°C で 2 時間、続いて 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記のアルファ 1,4 マンノビオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を加えて、25°C で 2 時間攪拌し、その後 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にアルファ 1,4 マンノビオース二糖鎖の結合を行った。その結果、図3で示されるアルファ 1,4 マンノビオース二糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム（略称：A4） 2ml（総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g、平均粒径 100nm）が得られた。

実施例7 リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン（HSA）上へのアルファ 1,6 マンノビオース二糖鎖の結合

アルファ 1,6 マンノビオース二糖鎖 (Calbiochem Co., USA) 50 μ g を 0.25g の NH_4HCO_3 を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37°C で 3 日間攪拌した後、0.45 μ m のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してアルファ 1,6 マンノビオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°C で 2 時間、続いて 7°C で

一晚攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記のアルファ 1,6 マンノビオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を加えて、25°C で 2 時間攪拌し、その後 7°C で一晚攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にアルファ 1,6 マンノビオース二糖鎖の結合を行った。その結果、図 4 で示されるアルファ 1,6 マンノビオース二糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム (略称: A 6) 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g、平均粒径 100nm) が得られた。

実施例 8 リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上へのアルファ 1,3 アルファ 1,6 マンノトリオース三糖鎖の結合

アルファ 1,3 アルファ 1,6 マンノトリオース三糖鎖 (Calbiochem Co., USA) 50 μ g を 0.25g の NH_4HCO_3 を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37°C で 3 日間攪拌した後、0.45 μ m のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してアルファ 1,3 アルファ 1,6 マンノトリオース三糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を得た。次に、実施例 3 で得たリポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°C で 2 時間、続いて 7°C で一晚攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記のアルファ 1,3 アルファ 1,6 マンノトリオース三糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を加えて、25°C で 2 時間攪拌し、その後 7°C で一晚攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にアルファ 1,3 アルファ 1,6 マンノトリオース三糖鎖の結合を行った。その結果、図 5 で示されるアルファ 1,3 アルファ 1,6 マンノトリオース三糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム (略称: A 3 6) 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g、平均粒径 100nm) が得られた。

実施例 9 リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上へのオリゴマンノース 3 五糖鎖の結合

オリゴマンノース 3 五糖鎖 (Calbiochem Co., USA) 50 μ g を 0.25g の NH_4HCO_3 を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37°C で 3 日間攪拌した後、0.45 μ m のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してオリゴマンノース 3 五糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を得た。次に、実施例 3 で得たりポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°C で 2 時間、続いて 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したりポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記のオリゴマンノース 3 五糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を加えて、25°C で 2 時間攪拌し、その後 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にオリゴマンノース 3 五糖鎖の結合を行った。その結果、図 6 で示されるオリゴマンノース 3 五糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したりポソーム (略称: Man 3) 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g、平均粒径 100nm) が得られた。

実施例 10 リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上へのオリゴマンノース 4 b 六糖鎖の結合

オリゴマンノース 4 b 六糖鎖 (Calbiochem Co., USA) 50 μ g を 0.25g の NH_4HCO_3 を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37°C で 3 日間攪拌した後、0.45 μ m のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してオリゴマンノース 4 b 六糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を得た。次に、実施例 3 で得たりポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°C で 2 時間、続いて 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したりポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記のオリゴマンノース 4 b 六糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を加えて、25°C で 2 時間攪拌し、その後 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にオリゴマンノース 4 b 六糖鎖の結合を行った。その結果、図 7 で示されるオリゴマンノース 4 b 六糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したりポソーム (略称: Man 4b) 2ml (総脂質

量 2mg、総蛋白量 200 μ g、平均粒径 100nm) が得られた。

実施例 1 1 リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上へのオリゴマンノース 5 七糖鎖の結合

オリゴマンノース 5 七糖鎖 (Calbiochem Co., USA) 50 μ g を 0.25g の NH_4HCO_3 を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37°C で 3 日間攪拌した後、0.45 μ m のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してオリゴマンノース 5 七糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を得た。次に、実施例 3 で得たりポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°C で 2 時間、続いて 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記のオリゴマンノース 5 七糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を加えて、25°C で 2 時間攪拌し、その後 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にオリゴマンノース 5 七糖鎖の結合を行った。その結果、図 8 で示されるオリゴマンノース 5 七糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム (略称: Man 5) 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g、平均粒径 100nm) が得られた。

実施例 1 2 リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上へのオリゴマンノース 6 八糖鎖の結合

オリゴマンノース 6 八糖鎖 (Calbiochem Co., USA) 50 μ g を 0.25g の NH_4HCO_3 を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37°C で 3 日間攪拌した後、0.45 μ m のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してオリゴマンノース 6 八糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を得た。次に、実施例 3 で得たりポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°C で 2 時間、続いて 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記のオリゴマンノース 6 八糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を加えて、25°C で 2 時間攪拌し、その後 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結

合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にオリゴマンノース 6 八糖鎖の結合を行った。その結果、図 9 で示されるオリゴマンノース 6 八糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム（略称：Ma n 6） 2ml（総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g、平均粒径 100nm）が得られた。

実施例 1 3 リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン（HSA）上へのオリゴマンノース 7 九糖鎖の結合

オリゴマンノース 7 九糖鎖 (Calbiochem Co., USA) 50 μ g を 0.25g の NH_4HCO_3 を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37°C で 3 日間攪拌した後、0.45 μ m のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してオリゴマンノース 7 九糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を得た。次に、実施例 3 で得たりポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°C で 2 時間、続いて 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記のオリゴマンノース 7 九糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を加えて、25°C で 2 時間攪拌し、その後 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にオリゴマンノース 7 九糖鎖の結合を行った。その結果、図 10 で示されるオリゴマンノース 7 九糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム（略称：Ma n 7） 2ml（総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g、平均粒径 100nm）が得られた。

実施例 1 4 リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン（HSA）上へのオリゴマンノース 8 十糖鎖の結合

オリゴマンノース 8 十糖鎖 (Calbiochem Co., USA) 50 μ g を 0.25g の NH_4HCO_3 を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37°C で 3 日間攪拌した後、0.45 μ m のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してオリゴマンノース 8 十糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を得た。次に、実施例 3 で得たりポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°C で 2 時間、続いて 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したり

ポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記のオリゴマンノース 8 十糖鎖のグリコシルアミン化合物 $50\mu\text{g}$ を加えて、 25°C で 2 時間攪拌し、その後 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にオリゴマンノース 8 十糖鎖の結合を行った。その結果、図 11 で示されるオリゴマンノース 8 十糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム (略称: M a n 8) 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 $200\mu\text{g}$ 、平均粒径 100nm) が得られた。

実施例 15 リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上へのオリゴマンノース 9 十一糖鎖の結合

オリゴマンノース 9 十一糖鎖 (Calbiochem Co., USA) $50\mu\text{g}$ を 0.25g の NH_4HCO_3 を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、 37°C で 3 日間攪拌した後、 $0.45\mu\text{m}$ のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してオリゴマンノース 9 十一糖鎖のグリコシルアミン化合物 $50\mu\text{g}$ を得た。次に、実施例 3 で得たリポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°C で 2 時間、続いて 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記のオリゴマンノース 9 十一糖鎖のグリコシルアミン化合物 $50\mu\text{g}$ を加えて、 25°C で 2 時間攪拌し、その後 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にオリゴマンノース 9 十一糖鎖の結合を行った。その結果、図 12 で示されるオリゴマンノース 9 十一糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム (略称: M a n 9) 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 $200\mu\text{g}$ 、平均粒径 100nm) が得られた。

実施例 16 リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上への tris(hydroxymethyl)aminomethane の結合

比較試料としてのリポソームを調製するために、実施例 3 で得たリポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°C で 2 時間、続いて 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結

合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に tris(hydroxymethyl)aminomethane(Wako Co., Japan) 13mg を加えて、25℃で 2 時間攪拌し、その後 7℃で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP に tris(hydroxymethyl)aminomethane の結合を行った。その結果、図 3 1 で示される tris(hydroxymethyl)aminomethane とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合した比較試料としてのリポソーム(略称: T R I S) 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g、平均粒径 100nm) が得られた。

実施例 1 7 リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上の親水性化処理

実施例 4 ~ 1 5 において調製された 1 2 種類の糖鎖が結合したリポソームについて、それぞれ別々に以下の手順によりリポソーム上の HSA 蛋白質表面の水和性化処理を行った。1 2 種の糖鎖結合リポソーム 2ml に、別々に、tris(hydroxymethyl)aminomethane 13mg を加えて、25℃で 2 時間、その後 7℃で一晩攪拌した後、XM300 膜と PBS 緩衝液(pH 7.2)で限外濾過し未反応物を除去して、最終産物である水和性化処理された 1 2 種類の糖鎖結合リポソーム複合体(略称: A2、A3、A4、A6、A36、Man3、Man4、Man5、Man6、Man7、Man8、Man9) を各 2ml を得た。

実施例 1 8 各種の糖鎖結合リポソーム複合体によるレクチン結合活性阻害効果の測定

実施例 4 ~ 1 5 および実施例 1 7 で調製した 1 2 種の糖鎖結合リポソーム複合体の in vitro でのレクチン結合活性は、常法(Yamazaki, N. (1999) Drug Delivery System, 14, 498-505)に従いレクチン固定化マイクロプレートを用いた阻害実験で測定した。すなわち、レクチン(Con A; R&D Systems Co., USA)を 96 穴マイクロプレートに固定化した。このレクチン固定化プレートに、比較リガンドであるビオチン化したフェチュイン 0.1 μ g とともに、濃度の異なる各種の糖鎖結合リポソーム複合体(蛋白質質量として、0.01 μ g、0.04 μ g、0.11 μ g、0.33 μ g、1 μ g) を加え、4℃で 2 時間インキュベートした。PBS(pH 7.2)で 3 回洗浄した後、horseradish peroxidase(HRPO)結合ストレプトアビジンを添加し、さらに 4℃で 1 時間インキュベート、PBS(pH 7.2)で 3 回洗浄し、ペルオキシダーゼ基質を添加し

て室温で静置、405nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (Molecular Devices Corp., USA) で測定した。フェチュインのビオチン化は、sulfo-NHS-biotin reagent (Pierce Co., USA) 処理後、Centricon-30 (Amicon Co., USA) により精製した。HRP0 結合ストレプトアビジンは、HRP0 の酸化と NaBH_3CN を用いた還元アミノ化法によるストレプトアビジンの結合により調製した。この測定結果を表 1 に示す。

表 1

標的指向性リボソーム

表 1 : 各種の糖鎖結合リボソーム複合体がレクチン結合活性阻害効果を示す実験結果

リボソーム複合体	リボソーム複合体の各濃度 (μg 蛋白質) における阻害効果 (吸光度)				
	0.006 μg	0.02 μg	0.06 μg	0.17 μg	0.5 μg
A2	0.192	0.196	0.192	0.169	0.155
A3	0.178	0.178	0.178	0.170	0.142
A4	0.192	0.196	0.192	0.175	0.153
A6	0.182	0.196	0.182	0.169	0.151
A36	0.205	0.215	0.205	0.192	0.150
Man3	0.201	0.211	0.201	0.177	0.144
Man4	0.171	0.203	0.171	0.157	0.148
Man5	0.215	0.221	0.215	0.196	0.164
Man6	0.210	0.222	0.210	0.207	0.125
Man7	0.213	0.214	0.213	0.183	0.137
Man8	0.211	0.216	0.211	0.188	0.132
- Man9	0.208	0.211	0.208	0.186	0.135

実施例 19 クロラミン T 法による各種糖鎖結合リボソームの ^{125}I 標識

クロラミン T (Wako Pure Chemical Co., Japan) 溶液並びに二亜硫酸ナトリウム溶液をそれぞれ 3mg/ml 並びに 5mg/ml となるように用事調製して用いた。実施例 4 から 16 において調製した 12 種の糖鎖結合リボソーム並びに tris(hydroxymethyl)aminomethane 結合リボソームとを 50 μl ずつ別々にエッペンチューブに入れ、続いて ^{125}I -NaI (NEN Life Science Product, Inc. USA) を 15 μl 、クロラミン T 溶液を 10 μl 加え反応させた。5 分ごとにクロラミン T 溶液 10 μl を加え、この操作を 2 回繰り返した後 15 分後に還元剤として二亜硫酸ナトリウム 100 μl 加え、反応を停止させた。次に、Sephadex G-50 (Pharmacia Biotech, Sweden) カラムクロマト上に乗せ、PBS で溶出、標識体を精製した。最後に、非標識-リボソーム複合体を添加して比活性 (4×10^6 Bq/mg protein) を調整して 13 種類の ^{125}I 標識リボソーム液を得た。

実施例 20 各種の糖鎖結合リポソーム複合体の担癌マウスでの各組織への分布量の測定

Ehrlich ascites tumor (EAT) 細胞 (約 2×10^7 個) を雄性 ddY マウス (7 週齢) 大腿部皮下に移植し、癌組織が 0.3~0.6g に発育 (6~8 日後) したものを本実験に用いた。この担癌マウスに実施例 19 により ^{125}I 標識した 12 種の糖鎖並びに tris(hydroxymethyl)aminomethane 結合リポソーム複合体 0.2ml を蛋白質量として $3 \mu\text{g}$ /一匹の割合となるように尾静脈に注入投与し、60 分後に組織 (血液、肝臓、脾臓、肺、脳、癌組織、癌の周囲の炎症組織、リンパ節) を摘出、各組織の放射能をガンマカウンタ (Aloka ARC 300) で測定した。なお、各組織への放射能分布量は、投与全放射能に対する各組織 1g 当たりの放射能の割合 (%投与量/g 組織) で表示した。この結果を図 13~図 22 に示す。

実施例 21 リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上への 3'-シアリルラクトース三糖鎖の結合 (糖鎖結合量が異なるもの 3 種類)

3'-シアリルラクトース三糖鎖 (Wako Pure Chemical Co., Japan) (1) $50 \mu\text{g}$ 、又は、2) $200 \mu\text{g}$ 、又は、3) 1mg) を 0.25g の NH_4HCO_3 を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、 37°C で 3 日間攪拌した後、 $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結して 3'-シアリルラクトース三糖鎖のグリコシルアミン化合物 $50 \mu\text{g}$ を得た。次に、実施例 3 で得たリポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°C で 2 時間、続いて 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記の 3'-シアリルラクトース三糖鎖のグリコシルアミン化合物 $50 \mu\text{g}$ を加えて、 25°C で 2 時間攪拌し、その後 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP に 3'-シアリルラクトース三糖鎖の結合を行った。その結果、糖鎖結合量が異なるもの 3 種類の図 22 で示される 3'-シアリルラクトース三糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム (略称: 1) 3SL-1、2) 3SL-2、3) 3SL-3) 各 2ml (総脂質量 2mg 、総蛋白量 $200 \mu\text{g}$ 、平均粒径 100nm) が得られた。

実施例 2 2 リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上への 6'-シアリルラクトース三糖鎖の結合 (糖鎖結合量が異なるもの 3 種類)

6'-シアリルラクトース三糖鎖 (Wako Pure Chemical Co., Japan) (1) 50 μ g、又は、2) 200 μ g、又は、3) 1mg) を 0.25g の NH_4HCO_3 を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37°C で 3 日間攪拌した後、0.45 μ m のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結して 6'-シアリルラクトース三糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を得た。次に、実施例 3 で得たりポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°C で 2 時間、続いて 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記の 6'-シアリルラクトース三糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を加えて、25°C で 2 時間攪拌し、その後 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP に 6'-シアリルラクトース三糖鎖の結合を行った。その結果、糖鎖結合量が異なるもの 3 種類の図 2 3 で示される 6'-シアリルラクトース三糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム (略称: 1) 6 S L-1、2) 6 S L-2、3) 6 S L-3) 各 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g、平均粒径 100nm) が得られた。

実施例 2 3 リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上への 3'-シアリルラクトサミン糖鎖の結合 (糖鎖結合量が異なるもの 3 種類)

3'-シアリルラクトサミン糖鎖 (Wako Pure Chemical Co., Japan) (1) 50 μ g、又は、2) 200 μ g、又は、3) 1mg) を 0.25g の NH_4HCO_3 を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37°C で 3 日間攪拌した後、0.45 μ m のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結して 3'-シアリルラクトサミン糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を得た。次に、実施例 3 で得たりポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°C で 2 時間、続いて 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記の 3'-シアリルラクトサミン糖鎖のグリコシルアミ

ン化合物 50 μ g を加えて、25°C で 2 時間攪拌し、その後 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP に 3'-シアリルラクトサミン糖鎖の結合を行った。その結果、糖鎖結合量が異なるもの 3 種類の図 2 4 で示される 3'-シアリルラクトサミン糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム (略称: 1) 3 S L N-1、2) 3 S L N-2、3) 3 S L N-3) 各 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g、平均粒径 100nm) が得られた。

実施例 2 4 リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上への 6'-シアリルラクトサミン糖鎖の結合 (糖鎖結合量が異なるもの 3 種類)

6'-シアリルラクトサミン糖鎖 (Wako Pure Chemical Co., Japan) (1) 50 μ g、又は、2) 200 μ g、又は、3) 1mg) を 0.25g の NH_4HCO_3 を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37°C で 3 日間攪拌した後、0.45 μ m のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結して 6'-シアリルラクトサミン糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を得た。次に、(実施例 3) で得たリポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°C で 2 時間、続いて 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記の 6'-シアリルラクトサミン糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を加えて、25°C で 2 時間攪拌し、その後 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP に 6'-シアリルラクトサミン糖鎖の結合を行った。その結果、糖鎖結合量が異なるもの 3 種類の図 2 5 で示される 6'-シアリルラクトサミン糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム (略称: 1) 6 S L N-1、2) 6 S L N-2、3) 6 S L N-3) 各 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g、平均粒径 100nm) が得られた。

実施例 2 5 リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上の親水性化処理

実施例 2 1 ~ 2 4 の手段により調整された各 1 2 種類の糖鎖が結合したリポソームについて、それぞれ別々に以下の手順によりリポソーム上の HSA 蛋白質表面の親水性化処理を行った。1 2 種の糖鎖結合リポソーム 2ml に、別々に、

tris(hydroxymethyl)aminomethane 13mg を加えて、25℃で2時間、その後7℃で一晩攪拌した後、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過し未反応物を除去して、最終産物である親水性化処理された 12 種類の糖鎖結合リポソーム複合体 (略称: 3SL-2、3SL-2、3SL-3、6SL-1、6SL-2、6SL-3、3SLN-1、3SLN-2、3SLN-3、6SLN-1、6SLN-2、6SLN-3) 各 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g、平均粒径 100nm) を得た。

実施例 26 各種の糖鎖結合リポソーム複合体によるレクチン結合活性阻害効果の測定

実施例 21～24 および実施例 16 の手段により調製した各 12 種の糖鎖結合リポソーム複合体の *in vitro* でのレクチン結合活性は、常法 (Yamazaki, N. (1999) Drug Delivery System, 14, 498-505) に従いレクチン固定化マイクロプレートを用いた阻害実験で測定した。すなわち、レクチン (E-selectin; R&D Systems Co., USA) を 96 穴マイクロプレートに固定化した。このレクチン固定化プレートに、比較リガンドであるビオチン化したフコシル化フェチュイン 0.1 μ g とともに、濃度の異なる各種の糖鎖結合リポソーム複合体 (蛋白質質量として、0.01 μ g、0.04 μ g、0.11 μ g、0.33 μ g、1 μ g) を加え、4℃で2時間インキュベートした。PBS (pH 7.2) で3回洗浄した後、horseradish peroxidase (HRPO) 結合ストレプトアビジンを添加し、さらに4℃で1時間インキュベート、PBS (pH 7.2) で3回洗浄し、ペルオキシダーゼ基質を添加して室温で静置、405nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (Molecular Devices Corp., USA) で測定した。フコシル化フェチュインのビオチン化は、sulfo-NHS-biotin reagent (Pierce Co., USA) 処理後、Centricon-30 (Amicon Co., USA) により精製した。HRPO 結合ストレプトアビジンは、HRPO の酸化と NaBH₃CN を用いた還元アミノ化法によるストレプトアビジンの結合により調製した。この測定結果を表 2 に示す。

表 2

腸管吸収制御性リボソーム

表 2

リボソーム 複合体	リボソーム複合体の各濃度 (μg 蛋白質) における阻害効果 (吸光度)				
	0.01 μg	0.04 μg	0.11 μg	0.33 μg	1 μg
3SL-1	0.154	0.147	0.135	0.120	0.097
3SL-2	0.149	0.142	0.124	0.118	0.098
3SL-3	0.214	0.214	0.210	0.183	0.167
6SL-1	0.177	0.171	0.167	0.160	0.114
6SL-2	0.196	0.184	0.169	0.160	0.159
6SL-3	0.214	0.207	0.196	0.192	0.183
3SLN-1	0.219	0.198	0.180	0.164	0.119
3SLN-2	0.155	0.155	0.151	0.119	0.096
3SLN-3	0.216	0.198	0.187	0.146	0.132
6SLN-1	0.257	0.246	0.233	0.200	0.151
6SLN-2	0.250	0.250	0.230	0.199	0.158
6SLN-3	0.248	0.231	0.227	0.201	0.144

実施例 27 クロラミン T 法による各種糖鎖結合リボソームの ^{125}I 標識

クロラミン T (Wako Pure Chemical Co., Japan) 溶液並びに二亜硫酸ナトリウム溶液をそれぞれ 3mg/ml 並びに 5mg/ml となるように用事調製して用いた。実施例 21 から 24 および実施例 16 により調製した 13 種の糖鎖結合リボソーム並びに tris(hydroxymethyl)aminomethane 結合リボソームとを 50 μl ずつ別々にエッペンチューブに入れ、続いて ^{125}I -NaI (NEN Life Science Product, Inc. USA) を 15 μl 、クロラミン T 溶液を 10 μl 加え反応させた。5 分ごとにクロラミン T 溶液 10 μl を加え、この操作を 2 回繰り返した後 15 分後に還元剤として二亜硫酸ナトリウム 100 μl 加え、反応を停止させた。次に、Sephadex G-50 (Pharmacia Biotech. Sweden) カラムクロマト上に乗せ、PBS で溶出、標識体を精製した。最後に、非標識-リボソーム複合体を添加して比活性 (4×10^6 Bq/mg protein) を調整して 13 種類の ^{125}I 標識リボソーム液を得た。

実施例 28 各種の糖鎖結合リボソーム複合体のマウスでの腸管から血中への移行量の測定

一昼夜水分以外絶食した雄性 ddY マウス (7 週齢) に、実施例 27 により ^{125}I 標識された 13 種の糖鎖結合並びに tris(hydroxymethyl)aminomethane 結合リボソーム複合体 0.2ml を蛋白質量として 3 μg /一匹の割合になるように、マウス用経口ゾンデで腸管内に強制投与した後、10 分後にネンブタール麻酔下で下大動脈

より血液 1ml を採血した。そして、血中の ^{125}I 放射能をガンマーカウンター (Alola ARC300) で測定した。さらに、各種のリポソーム複合体の生体内安定性を調べる目的で、各血液の血清を Sephadex G-50 で再クロマトしたが、いずれも大半の放射能が高分子量のボイドフラクションにみられ、各種のリポソーム複合体は生体内においても安定性を有していた。なお、腸管から血中への放射能移行量は、投与全放射能に対する血液 1ml 当たりの放射能の割合 (%投与量/ml 血液) で表示した。この結果を図 27 から図 31 に示す。

実施例 29 抗癌剤ドキソルビシン封入リポソームの調製

リポソームはコール酸透析法を用いて調製した。すなわち、ジパルミトイルフォスファチジルコリン、コレステロール、ジセチルフォスフェート、ガングリオシド及びジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンをモル比でそれぞれ 35 : 40 : 5 : 15 : 5 の割合で合計脂質量 45.6mg になるように混合し、コール酸ナトリウム 46.9mg 添加し、クロロホルム/メタノール溶液 3ml に溶解した。この溶液を蒸発させ、沈殿物を真空中で乾燥させることによって脂質膜を得た。得られた脂質膜を TAPS 緩衝生理食塩液 (pH8.4) 10ml に懸濁、超音波処理し、透明なミセル懸濁液 10ml を得た。このミセル懸濁液に TAPS 緩衝液 (pH8.4) で 3mg/1ml になるよう完全に溶解した抗癌剤ドキソルビシンを攪拌しながらゆっくりと滴下して均一に混合した後、このドキソルビシン入りミセル懸濁液を PM10 膜 (AmiconCo., USA) と TAPS 緩衝生理食塩液 (pH8.4) を用いた限外濾過にかけ均一な抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム粒子懸濁液 10ml を調製した。得られた生理食塩懸濁液中 (37℃) の抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置 (Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) により測定した結果、粒子径は 50~350nm、ゼータ電位は -30~-10mV であった。

実施例 30 抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム脂質膜面上の親水性化処理

実施例 29 で調製した抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム溶液 10ml を XM300 膜 (Amicon Co., USA) と CBS 緩衝液 (pH 8.5) を用いた限外濾過にかけ溶液の pH を 8.5 にした。次に、架橋試薬 bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS3; Pierce Co., USA) 10ml を加え、25℃で 2 時間攪拌した。その後、更に 7℃で一晩攪拌して

リポソーム膜上の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンと BS3 との化学結合反応を完結した。そして、このリポソーム液を XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過にかけた。次に、CBS 緩衝液 (pH 8.5) 1ml に溶かした tris(hydroxymethyl)aminomethane 40mg をリポソーム液 10ml に加えて、25℃で 2 時間攪拌後、7℃で一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質に結合した BS3 と tris(hydroxymethyl)aminomethane との化学結合反応を完結した。これにより、抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム膜の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン上に tris(hydroxymethyl)aminomethane の水酸基が配位して水和親水性化された。

実施例 3 1 抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム膜面上へのヒト血清アルブミン (HSA) の結合

既報の手法 (Yamazaki, N., Kodama, M. and Gabius, H.-J. (1994) *Methods Enzymol.* 242, 56-65) により、カップリング反応法を用いて行った。すなわち、この反応は 2 段階化学反応で行い、まずはじめに、実施例 2 で得られた 10ml のリポソーム膜面上に存在するガングリオシドを 1ml の TAPS 緩衝液 (pH 8.4) に溶かしたメタ過ヨウ素酸ナトリウム 43mg を加えて室温で 2 時間攪拌して過ヨウ素酸酸化した後、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 8.0) で限外濾過することにより酸化されたりポソーム 10ml を得た。このリポソーム液に、20mg のヒト血清アルブミン (HSA) を加えて 25℃で 2 時間攪拌し、次に PBS (pH 8.0) に 2M NaBH₃CN 100 μ l を加えて 10℃で一晩攪拌してリポソーム上のガングリオシドと HSA とのカップリング反応で HSA を結合した。そして、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過をした後、HSA 結合抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム液 10ml を得た。

実施例 3 2 抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上へのアルファ 1,6 マンノビオース二糖鎖の結合とリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理

アルファ 1,6 マンノビオース二糖鎖 (Calbiochem Co., USA) 50 μ g を 0.25g の NH₄HCO₃ を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37℃で 3 日間攪拌した後、0.45 μ m のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してアルファ 1,6 マンノビオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を得た。次に、実施例 3 1 で

得た抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25℃で 2 時間、続いて 7℃で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記のアルファ 1,6 マンノビオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を加えて、25℃で 2 時間攪拌し、その後 7℃で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にアルファ 1,6 マンノビオース二糖鎖の結合を行った。次に、このリポソーム液に tris(hydroxymethyl)aminomethane (Wako Co., Japan) 13mg を加えて、25℃で 2 時間攪拌し、その後 7℃で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP に tris(hydroxymethyl)aminomethane の結合を行った。その結果、図 3 2 で示される tris(hydroxymethyl)aminomethane とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理をしたリポソームを得た。その結果、図 4 で示されるアルファ 1,6 マンノビオース二糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理をした抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム (略称: DX-A 6) 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g) が得られた。得られた生理食塩懸濁液中 (37℃) の抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置 (Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) により測定した結果、粒子径は 50~350nm、ゼータ電位は -30~-10mV であった。

実施例 3 3 抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上への 3-フコシルラクトース三糖鎖の結合とリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理

3-フコシルラクトース三糖鎖 (Calbiochem Co., USA) 50 μ g を 0.25g の NH_4HCO_3 を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37℃で 3 日間攪拌した後、0.45 μ m のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結して 3-フコシルラクトース三糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を得た。次に、実施例 3 1 で得た抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'

-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25℃で 2 時間、続いて 7℃で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記の 3-フコシルラクトース三糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を加えて、25℃で 2 時間攪拌し、その後 7℃で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP に 3-フコシルラクトース三糖鎖の結合を行った。次に、このリポソーム液に tris(hydroxymethyl)aminomethane (Wako Co., Japan) 13mg を加えて、25℃で 2 時間攪拌し、その後 7℃で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP に tris(hydroxymethyl)aminomethane の結合を行った。その結果、図 3 2 で示される tris(hydroxymethyl)aminomethane とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理をしたリポソームを得た。その結果、図 3 8 で示される 3-フコシルラクトース三糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理をした抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム (略称: DX-3 FL) 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g) が得られた。得られた生理食塩懸濁液中 (37℃) の抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置 (Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) により測定した結果、粒子径は 50~350nm、ゼータ電位は -30~-10mV であった。

実施例 3 4 抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上への tris(hydroxymethyl)aminomethane の結合によるリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理

比較試料としての抗癌剤ドキソルビシン封入リポソームを調製するために、実施例 3 1 で得た抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25℃で 2 時間、続いて 7℃で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理リポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に

tris(hydroxymethyl)aminomethane(Wako Co., Japan)13mg を加えて、25℃で 2 時間攪拌し、その後 7℃で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP に tris(hydroxymethyl)aminomethane の結合を行った。その結果、図 3 2 で示される tris(hydroxymethyl)aminomethane とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカー蛋白質(HSA)の親水性化処理をした比較試料としての抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム(略称: DX-TRIS) 2ml(総脂質量 2mg、総蛋白質量 200 μ g)が得られた。得られた生理食塩懸濁液中(37℃)の抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置(Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK)により測定した結果、粒子径は 50~350nm、ゼータ電位は-30~-10mV であった。

実施例 3 5 各種の糖鎖結合リポソーム複合体の尾静注投与による担癌マウスでの制癌効果の測定

Ehrlich ascites tumor (EAT) 細胞(約 2×10^7 個)を雄性 ddY マウス(7 週齢)の右大腿部皮下に移植し、癌組織が 50~100 立方ミリメートルに発育(6~8 日後)したもの約 40 匹を本実験に用いた。この担癌マウス 10 匹づつを 4 群に分けてそれぞれの群に、実施例 3 2 と実施例 3 4 で調製した糖鎖結合抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム液または糖鎖なし抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム液または生理食塩水またはフリーのドキソルビシン液を 0.2ml、3~4 日置きに 4 回(癌細胞移植後、7 日、11 日、14 日、18 日)、尾静注投与した。腫瘍体積は、移植腫瘍の長径(L)および短径(S)をノギスで測定し、次の式により算出した。腫瘍体積(立方ミリメートル) = $1/2 \times L \times S \times S$ この結果を図 3 9 または図 4 0 に示す。図に示すように、本発明のリポソームにドキソルビシンを封入したものをを用いた場合に腫瘍の体積の上昇は抑制され、腫瘍抑制効果が認められた。

実施例 3 6 各種の糖鎖結合リポソーム複合体の経口投与による担癌マウスでの制癌効果の測定

Ehrlich ascites tumor (EAT) 細胞(約 2×10^7 個)を雄性 ddY マウス(7 週齢)の右大腿部皮下に移植し、癌組織が 50~100 立方ミリメートルに発育(6~8 日後)したもの約 30 匹を本実験に用いた。この担癌マウス 10 匹づつを 3 群に分け

てそれぞれの群に、実施例 3 3 と実施例 3 4 で調製した糖鎖結合抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム液または糖鎖なし抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム液または生理食塩水を 0.6ml、3～4 日置きに 4 回（癌細胞移植後、7 日、11 日、14 日、18 日）、経口投与した。腫瘍体積は、移植腫瘍の長径（L）および短径（S）をノギスで測定し、次の式により算出した。腫瘍体積（立方ミリメートル）＝ $1/2 \times L \times S \times S$ この結果を図 4 1 または図 4 2 に示す。図に示すように、本発明のリポソームにドキソルビシンを封入したものを用いた場合に腫瘍の体積の上昇は抑制され、腫瘍抑制効果が認められた。

実施例 3 7 白血病治療用標的指向性リポソームの調製

（1） ドキソルビシン封入リポソームの調製と封入薬物定量と保存安定性

リポソームはコール酸透析法を用いて調製した。すなわち、ジパルミトイルフォスファチジルコリン、コレステロール、ジセチルフォスフェート、ガングリオシド及びジパルミトイルフォスファチジエタノールアミンをモル比でそれぞれ 35 : 40 : 5 : 15 : 5 の割合で合計脂質量 45.6mg になるように混合し、コール酸ナトリウム 46.9mg 添加し、クロロホルム／メタノール溶液 3ml に溶解した。この溶液を蒸発させ、沈殿物を真空中で乾燥させることによって脂質膜を得た。得られた脂質膜を TAPS 緩衝液（pH8.4）3ml に懸濁、超音波処理し、透明なミセル懸濁液 3ml を得た。このミセル懸濁液に PBS 緩衝液（pH7.2）を加えて 10ml にしてから、更に TAPS 緩衝液（pH8.4）で 3mg/1ml になるよう完全に溶解したドキソルビシンを攪拌しながらゆっくりと滴下して均一に混合した後、このドキソルビシン入りミセル懸濁液を PM10 膜（AmiconCo., USA）と TAPS 緩衝液（pH8.4）を用いた限外濾過にかけ均一なドキソルビシン封入リポソーム粒子懸濁液 10ml を調製した。得られた生理食塩懸濁液中（37℃）の抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置（Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK）により測定した結果、平均粒子径は 50～350nm、平均ゼータ電位は -30～-10mV であった。このリポソームの封入薬物量を吸光度 485nm で測定するとおよそ 110 μ g/ml の濃度でドキソルビシンが封入されていることがわかった。このドキソルビシン封入リポソームは、冷蔵庫中に 1 年間保存し後にも沈殿や凝集を起こすことなく安定であった。

(2) 抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム脂質膜面上の親水性化処理

(1) で調製した抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム溶液 10ml を XM300 膜 (Amicon Co., USA) と CBS 緩衝液 (pH 8.5) を用いた限外濾過にかけ溶液の pH を 8.5 にした。次に、架橋試薬 bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS3; Pierce Co., USA) 10ml を加え、25℃で2時間攪拌した。その後、更に7℃で一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンと BS3 との化学結合反応を完結した。そして、このリポソーム液を XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過にかけた。次に、CBS 緩衝液 (pH 8.5) 1ml に溶かした tris(hydroxymethyl)aminomethane 40mg をリポソーム液 10ml に加えて、25℃で2時間攪拌後、7℃で一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質に結合した BS3 と tris(hydroxymethyl)aminomethane との化学結合反応を完結した。これにより、抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム膜の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン上に tris(hydroxymethyl)aminomethane の水酸基が配位して水和親水性化された。

(3) 抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム膜面上へのヒト血清アルブミン (HSA) の結合

既報の手法 (Yamazaki, N., Kodama, M. and Gabius, H.-J. (1994) *Methods Enzymol.* 242, 56-65) により、カップリング反応法を用いて行った。すなわち、この反応は2段階化学反応で行い、まずはじめに、実施例2で得られた 10ml のリポソーム膜面上に存在するガングリオシドを 1ml の TAPS 緩衝液 (pH 8.4) に溶かしたメタ過ヨウ素酸ナトリウム 43mg を加えて室温で2時間攪拌して過ヨウ素酸酸化した後、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 8.0) で限外濾過することにより酸化されたリポソーム 10ml を得た。このリポソーム液に、20mg のヒト血清アルブミン (HSA) を加えて 25℃で2時間攪拌し、次に PBS (pH 8.0) に 2M NaBH₃CN 100 μ l を加えて 10℃で一晩攪拌してリポソーム上のガングリオシドと HSA とのカップリング反応で HSA を結合した。そして、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過をした後、HSA 結合抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム液 10ml を得た。

(4) 抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上へのシアリルルイス X 型四糖鎖の結合とリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理

シアリルルイス X 型四糖鎖 (Calbiochem Co., USA) 50 μ g を 0.25g の NH_4HCO_3 を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37°C で 3 日間攪拌した後、0.45 μ m のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してシアリルルイス X 四糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を得た。次に、(3) で得た抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°C で 2 時間、続いて 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記のシアリルルイス X 型四糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を加えて、25°C で 2 時間攪拌し、その後 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にシアリルルイス X 型四糖鎖の結合を行った。次に、このリポソーム液に tris(hydroxymethyl)aminomethane (Wako Co., Japan) 13mg を加えて、25°C で 2 時間攪拌し、その後 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP に tris(hydroxymethyl)aminomethane の結合を行った。その結果、tris(hydroxymethyl)aminomethane とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理をしたリポソームを得た。その結果、シアリルルイス X 型四糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理をしたシアリルルイス X 型四糖鎖付き抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g) が得られた。得られた生理食塩懸濁液中 (37°C) のシアリルルイス X 型四糖鎖付き抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置 (Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) により測定した結果、粒子径は 50~350nm、ゼータ電位は -30~-10mV であった。

(5) 抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上への tris(hydroxymethyl)aminomethane の結合によるリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理

比較試料としての抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム (糖鎖の付いてないも

の)を調製するために、(3)で得た抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム液の一部 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25℃で 2 時間、続いて 7℃で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理リポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に tris(hydroxymethyl)aminomethane (Wako Co., Japan) 13mg を加えて、25℃で 2 時間攪拌し、その後 7℃で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP に tris(hydroxymethyl)aminomethane の結合を行った。その結果、図 3 2 で示される tris(hydroxymethyl)aminomethane とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理をした比較試料としての抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム (糖鎖の付いてないもの) 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g) が得られた。得られた生理食塩懸濁液中 (37℃) の抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム粒子 (糖鎖の付いてないもの) の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置 (Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) により測定した結果、粒子径は 50~350nm、ゼータ電位は -30~-10mV であった。

本実施例で製造したリポソームは、実施例 3 8 で用いた。

実施例 3 8 標的指向性リポソームによる白血病治療の検討

(1) リポソーム化塩酸ドキソルビシンの細胞傷害性の実験

ヒト白血病細胞として急性骨髄性白血病患者の白血病細胞から樹立された KG-1a 細胞を使用し、この細胞に対しては 10%牛胎児血清 (fetal bovine serum 以下 FBS) を含む RPMI 1640 培地で培養した。またヒト正常細胞として正常繊維芽細胞から樹立された MRC5 細胞を使用し、この細胞に対しては 10% FBS を含む MEM 培地で培養した。これら細胞で 10^5 個/ml の細胞浮遊液を作成し、96-ウェル培養プレート上に 10^4 個/well を播き培養した。24 時間後リポソーム化していない遊離の塩酸ドキソルビシン (以下 free Dox)、リポソーム化した塩酸ドキソルビシンで糖鎖を結合させていないもの (以下 L-Dox) そしてリポソーム化した塩酸ドキソルビシンでシアリルルイス X 糖鎖を結合させたもの (以下 L-Dox-SLX) をそれぞれ適当な濃度でそれぞれのウェルへ投与した。このとき FBS 等の濃度は

それぞれのウェルで同じ条件になるように調整された。抗癌剤を投与後 72 時間培養し、生き残った細胞を定量化、殺活性 (Killing Activities) を計算して、50% 阻害薬剤濃度 (50% growth inhibition concentration 以下 IC50) を求めた。細胞の定量化は抗癌剤を含んだ培地を除いた後 10% WST-8、10% FBS を含んだ 100 μ l の RPMI 1640 培地又は MEM 培地に置換し、3 時間培養後 485 nm の吸光度を測定した (550 nm の吸光度を参照値とした)。殺活性 (%) = 100 - (注目ウェルの 485 nm 吸光度 - 同じウェルの 550 nm 吸光度) / (無処置ウェルの 485 nm 吸光度 - 無処置ウェルの 550 nm 吸光度) X 100、以上の式から殺活性 (%) (以下 KA) を求めた。

以下の結果が得られた。

KG-1a 細胞に対する free Dox の IC50 は 0.18 μ M であり、L-Dox では 21.9 μ M、L-Dox-SLX では 5.9 μ M であった。MRC5 細胞に対する free Dox の IC50 は 8.4 μ M、L-Dox は 520 μ M、L-Dox-SLX は 802 μ M であった (表 3)。

表 3

	MRC5	KG-1a
Free Dox	8.4	0.18 \pm 0.081
L-Dox	520	21.9 \pm 4.83
L-Dox-SLX	802	5.9 \pm 1.85

Cytotoxicityは50%阻害薬剤濃度(IC50)(μ M)として表された。
ヒト正常細胞としてMRC5細胞が、ヒト白血病細胞としてKG-1a細胞が用いられた。

この結果より以下のことが判明した。

塩酸ドキソルビシンのリポソーム化によりその正常細胞に対する毒性は L-Dox で約 6 2 分の一へ、L-Dox-SLX で約 9 5 分の一へ低下した。これはリポソーム化により抗癌剤の毒性が非常に低下したことを示している。現在臨床で用いられている塩酸ドキソルビシンの投与量は一日 0.4 – 0.6 mg/Kg (0.67 – 1 μ M) を数日間という治療計画が多いことを考えると、正常細胞に対する IC50 値が 500 μ M 以上というのは非常に安全性が高いと考えられる。

しかしリポソーム化により白血病細胞に対する細胞傷害性も低下しており、KG-1a 細胞に対する L-Dox の IC50 は 21.9 μ M、free Dox の IC50 は 0.18 μ M で約 1 2 0 分の一へ低下していた。実際の生体内投与では free Dox の血中滞留性に対してリポソーム化製剤の血中滞留性は向上しているので、KG-1a 細胞に対する free Dox と L-Dox の生体内における薬効の差はこれほど大きくはないと思われるが、L-Dox の生体内薬効は free Dox と比較して低下している可能性があると考えられた。

そこで我々の糖鎖による指向性リポソームの機能を検討した。KG-1a 細胞に対する L-Dox-SLX の IC50 は 5.9 μ M で、L-Dox に比して細胞傷害性の低下はあまり大きくなっておらず、約 3 0 分の一程度にとどまっていた。これは近年 KG-1a 細胞を含む白血病細胞に L-セレクトインの発現が確認されており、そのリガンドとしてリポソームに結合させたシアリルルイス X 糖鎖が白血病細胞に結合した可能性があると思われた。そして MRC5 細胞に対する L-Dox と L-Dox-SLX の IC50 は差がなかった。これは L-セレクトインの発現の無い MRC5 細胞に対しては L-Dox-SLX の積極的集積は無く、L-Dox と同程度の集積しかないことを示していると考えられた。このシアリルルイス X 糖鎖の効果によりリポソームに指向性がもたらされ、またリポソーム化により低下した細胞傷害性の回復も期待できると考えられた。

L-Dox-SLX はリポソーム化により高い血中滞留性と正常細胞に対する低い細胞傷害性がもたらされており、しかも結合された糖鎖により白血病細胞に対して積極的に集積する理想的な指向性 DDS であると思われた。

(2) リポソーム化塩酸ドキソルビシンの細胞傷害性の増強と抑制に関する実験
ヒト白血病細胞 KG-1a を用いた。培養条件は実験 1) に同じであった。初めに

ヒトインターフェロン α (以下 IFN) の KG-1a 細胞に対する細胞傷害性を求めた。KA の求め方は (1) に同じであった。次に培地に IFN を付加した状態または付加していない状態で L-Dox と L-Dox-SLX の KA を求め、IFN による KA の増強を観察した。そしてさらに L-セレクトインの糖鎖結合中和抗体 (クローン: DREG56) によって IFN 付加時の L-Dox-SLX の KA が抑制されるか否かを観察した。また中和抗体自体の KA も測定した。

以下の結果が得られた。

IFN 自体の KG-1a 細胞に対する KA は IFN を培地へ 100 U / ml 入れた状態で 9.4 % \pm 7.34 あった。

培地へ IFN を 100 U / ml 付加した状態で L-Dox と L-Dox-SLX の KA を比較した (図 4 3)。L-Dox と L-Dox-SLX 中の塩酸ドキソルビシン濃度は 17.8 μ M であった。L-Dox の KA は IFN がない状態では 10 % \pm 10.5、IFN 付加状態で 19.2 % \pm 7.99 に増強されただけであった。IFN 自体の KA が 9.4 %であることを考えると L-Dox の IFN 付加による増強は単純に相加的であった。これに対して L-Dox-SLX の KA は IFN がない状態では 6.3 % \pm 11.6、IFN 付加状態で 44.1 % \pm 3.76 まで増強された。この増強効果は非常に大きく相乗的であった。

L-セレクトインに対する中和抗体を 0.3 μ g/ml の濃度で培地に入れ、抗体単独での KA を測定した。抗体は 0.3 μ g/ml の濃度で 16.3 % \pm 25.8 の KA を持っていた。

IFN 付加状態での L-Dox-SLX (塩酸ドキソルビシン濃度は 17.8 μ M) の KA は 47.2 % \pm 3.71 であったが、この状態に中和抗体を入れると KA は 23.2 % \pm 12.7 に抑制された (図 4 4)。中和抗体自体の KA を考えると IFN 付加時 L-Dox-SLX の KA はそのほとんどが抑制されたと思われた。

この結果より、以下のことが判明した。

IFN そしてインターフェロン γ 等は白血球上のセレクトイン発現を亢進させることが報告されている。我々が用いたヒト白血病細胞 KG-1a でもセレクトインの発現亢進が起きれば、L-Dox-SLX の KG-1a 細胞に対する集積性が向上し細胞傷害性が上がることを予測された。実験結果では糖鎖の無い L-Dox の KA が単純に L-Dox の KA と IFN 単独での KA の相加的値になっているのとは比して、L-Dox-SLX では IFN によってその KA は相乗的に増強された。このことは上記予測が正しいことを示唆

していると思われた。

また L-セレクトイン中和抗体による抑制実験では抗体により約 47 %の KA が約 23 %まで低下した。中和抗体自体が持っている KA が約 16 %であり、L-Dox-SLX の KA は一桁台まで抑制された可能性が高い。これは L-Dox-SLX の細胞傷害性の発現に L-セレクトインが関与していることを示唆していると思われる。すなわちリポソームに結合させたシアリルルイス X 糖鎖が白血病細胞上の L-セレクトインへ結合して、L-Dox-SLX の細胞傷害性が発現していると考えられた。

以上の結果は我々の DDS がヒト白血病細胞上のセレクトインを認識し集積するという指向性を持っていることを示唆しており、リポソームに結合させた糖鎖が機能していると考えられた。しかも IFN 等の付加による L-Dox-SLX の細胞傷害性の増強は臨床応用を考えると興味深い現象であり、この DDS の臨床的なポテンシャルをさらに高めるものと思われた。

実施例 39 担癌マウスでの薬物動態と制癌効果に関する検討

(1) 糖脂質型糖鎖を有するドキソルビシン封入リポソームの調製と封入薬物定量と保存安定性

リポソームはコール酸透析法を用いて調製した。すなわち、ジパルミトイルフオスファチジルコリン、コレステロール、ジセチルフオスフェート、ガングリオシド（糖脂質糖鎖として GM1:13%、GD1a:38%、GD1b:9%、GT1b:16%を含むもの）をモル比でそれぞれ 35:45:5:15 の割合で合計脂質量 45.6mg になるように混合し、コール酸ナトリウム 46.9mg 添加し、クロロホルム／メタノール溶液 3ml に溶解した。この溶液を蒸発させ、沈殿物を真空中で乾燥させることによって脂質膜を得た。得られた脂質膜を TAPS 緩衝液（pH8.4）3ml に懸濁、超音波処理し、透明なミセル懸濁液 3ml を得た。このミセル懸濁液に PBS 緩衝液（pH7.2）を加えて 10ml にしてから、更に TAPS 緩衝液（pH8.4）で 3mg/1ml になるよう完全に溶解したドキソルビシンを攪拌しながらゆっくりと滴下して均一に混合した後、このドキソルビシン入りミセル懸濁液を PM10 膜（AmiconCo., USA）と TAPS 緩衝液（pH8.4）を用いた限外濾過にかけ均一な糖脂質型糖鎖を有するドキソルビシン封入リポソーム粒子懸濁液 10ml を調製した。得られた生理食塩懸濁液中（37℃）の糖脂質型糖鎖を有する抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼ

ータ電位・粒子径・分子量測定装置 (Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) により測定した結果、粒子径は 50~350nm、ゼータ電位は -30~-10mV であった。このリポソームの封入薬物量を吸光度 485nm で測定するとおよそ 71 μ g/ml の濃度でドキソルビシンが封入されていることがわかった。このドキソルビシン封入リポソームは、冷蔵庫中に 1 年間保存し後にも沈殿や凝集を起こすことなく安定であった。

(2) 糖脂質型糖鎖を有するドキソルビシン封入リポソームの尾静注投与による担癌マウスでの薬物動態の測定

Ehrlich ascites tumor (EAT) 細胞 (約 2×10^7 個) を雄性 ddY マウス (7 週齢) の右大腿部皮下に移植し、癌組織が 50~100 立方ミリメートルに発育 (6~8 日後) したものの約 50 匹を本実験に用いた。この担癌マウス 25 匹づつを 2 群に分けてそれぞれの群に癌細胞移植後、糖脂質型糖鎖を有するドキソルビシン封入リポソーム液またはフリーのドキソルビシン液を 0.2ml 尾静注投与した。その後、経時的に各群 5 匹の血中または腫瘍組織中のドキソルビシン濃度を蛍光法 (470nm) で測定した。また、薬物血中濃度の時間曲線下面積 (AUC)、腫瘍組織及び細胞へのドキソルビシンの分布を蛍光顕微鏡で観察した。表 4 と図 4 5 から 5 0 のグラフと写真に示すように、従来のフリーのドキソルビシンに比較して、本発明のリポソームにドキソルビシンを封入したものをを用いた場合にドキソルビシンの血中滞留性は約百倍高くなり、腫瘍組織及び癌細胞へのドキソルビシンの集積効果も約数十倍高くなることが明らかとなった。

(3) 糖脂質型糖鎖を有するドキソルビシン封入リポソームの尾静注投与による担癌マウスでの制癌効果の測定

Ehrlich ascites tumor (EAT) 細胞 (約 2×10^7 個) を雄性 ddY マウス (7 週齢) の右大腿部皮下に移植し、癌組織が 50~100 立方ミリメートルに発育 (6~8 日後) したものの約 30 匹を本実験に用いた。この担癌マウス 10 匹づつを 3 群に分けてそれぞれの群に癌細胞移植後、糖脂質型糖鎖を有するドキソルビシン封入リポソーム液またはフリーのドキソルビシン液または生理食塩水を 0.2ml、3~4 日置きに 6 回尾静注投与した。腫瘍体積は、移植腫瘍の長径 (L) および短径 (S) をノギスで測定し、次の式により算出した。腫瘍体積 (立方ミリメートル) = $1/$

2 x L x S x S 図 4 5 から 5 0 のグラフと写真に示すように、従来のフリーのドキソルビシンに比較して、本発明のリポソームにドキソルビシンを封入したものをを用いた場合に腫瘍の体積の上昇は低濃度投与でも数倍強く抑制され、顕著な制癌効果が認められた。

表 4

	AUC_{0→∞} (mg x h/ml)
ドキソルビシン封入リポソーム (投与量 0.42 mg/kg)	5.72±0.31
フリードキソルビシン (投与量 1.4 mg/kg)	0.13±0.01

実施例 4 0 2 種類の親水性化処理を行ったリポソームの血中滞留性の検討

(1) リポソームの調製

リポソームはコール酸透析法を用いて調製した。すなわち、ジパルミトイルフォスファチジルコリン、コレステロール、ジセチルフォスフェート、ガングリオシド及びジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンをモル比でそれぞれ 35 : 40 : 5 : 15 : 5 の割合で合計脂質量 45.6mg になるように混合し、コール酸ナトリウム 46.9mg 添加し、クロロホルム／メタノール溶液 3ml に溶解した。この溶液を蒸発させ、沈殿物を真空中で乾燥させることによって脂質膜を得た。得られた脂質膜を TAPS 緩衝液 (pH8.4) 3ml に懸濁、超音波処理し、透明なミセル懸濁液 3ml を得た。このミセル懸濁液に PBS 緩衝液 (pH7.2) を加えて 5ml にしてから、更に TAPS 緩衝液 (pH8.4) で 2250mg/6ml になるよう完全に溶解したリン酸プレドニゾロンを攪拌しながらゆっくりと滴下して均一に混合した後、このリン酸プレドニゾロン入りミセル懸濁液を PM10 膜 (AmiconCo., USA) と TAPS 緩衝液 (pH8.4) を用いた限外濾過にかけ均一なリポソーム 10ml を調製した。得られた生理食塩懸

濁液中(37℃)のリポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置 (Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) により測定した結果、粒子径は 50~350nm、ゼータ電位は-30~-10mV であった。

(2) リポソーム脂質膜面上の tris(hydroxymethyl)aminomethane による親水性化処理

(1) で調製したリポソーム溶液 10ml を XM300 膜 (Amicon Co., USA) と CBS 緩衝液 (pH 8.5) を用いた限外濾過にかけ溶液の pH を 8.5 にした。次に、架橋試薬 bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS3; Pierce Co., USA) 10ml を加え、25℃で 2 時間攪拌した。その後、更に 7℃で一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンと BS3 との化学結合反応を完結した。そして、このリポソーム液を XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過にかけた。次に、CBS 緩衝液 (pH 8.5) 1ml に溶かした tris(hydroxymethyl)aminomethane 40mg をリポソーム液 10ml に加えて、25℃で 2 時間攪拌後、7℃で一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質に結合した BS3 と tris(hydroxymethyl)aminomethane との化学結合反応を完結した。これにより、リポソーム膜の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン上に tris(hydroxymethyl)aminomethane の水酸基が配位して水和親水性化された。

(3) リポソーム脂質膜面上のセロビオースによる親水性化処理

(1) で調製したリポソーム溶液 10ml を XM300 膜 (Amicon Co., USA) と CBS 緩衝液 (pH 8.5) を用いた限外濾過にかけ溶液の pH を 8.5 にした。次に、架橋試薬 bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS3; Pierce Co., USA) 10ml を加え、25℃で 2 時間攪拌した。その後、更に 7℃で一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンと BS3 との化学結合反応を完結した。そして、このリポソーム液を XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過にかけた。次に、CBS 緩衝液 (pH 8.5) 1ml に溶かしたセロビオース 50mg をリポソーム液 10ml に加えて、25℃で 2 時間攪拌後、7℃で一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質に結合した BS3 とセロビオースとの化学結合反応を完結した。これにより、リポソーム膜の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン上にセロビオースの水酸基が配位して水和親水性化された。

(4) tris(hydroxymethyl)aminomethane 結合リポソーム膜面上へのヒト血清アルブミン (HSA) の結合

既報の手法 (Yamazaki, N., Kodama, M. and Gabius, H.-J. (1994) *Methods Enzymol.* 242, 56-65) により、カップリング反応法を用いて行った。すなわち、この反応は2段階化学反応で行い、まずはじめに、(2) で得られた 10ml のリポソーム膜面上に存在するガングリオシドを 1ml の TAPS 緩衝液 (pH 8.4) に溶かしたメタ過ヨウ素酸ナトリウム 43mg を加えて室温で2時間攪拌して過ヨウ素酸酸化した後、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 8.0) で限外濾過することにより酸化されたりポソーム 10ml を得た。このリポソーム液に、20mg のヒト血清アルブミン (HSA) を加えて 25°C で2時間攪拌し、次に PBS (pH 8.0) に 2M NaBH₃CN 100 μ l を加えて 10°C で一晩攪拌してリポソーム上のガングリオシドと HSA とのカップリング反応で HSA を結合した。そして、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過をした後、HSA 結合リポソーム液 10ml を得た。

(5) セロビオース結合リポソーム膜面上へのヒト血清アルブミン (HSA) の結合

既報の手法 (Yamazaki, N., Kodama, M. and Gabius, H.-J. (1994) *Methods Enzymol.* 242, 56-65) により、カップリング反応法を用いて行った。すなわち、この反応は2段階化学反応で行い、まずはじめに、実施例3で得られた 10ml のリポソーム膜面上に存在するガングリオシドを 1ml の TAPS 緩衝液 (pH 8.4) に溶かしたメタ過ヨウ素酸ナトリウム 43mg を加えて室温で2時間攪拌して過ヨウ素酸酸化した後、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 8.0) で限外濾過することにより酸化されたりポソーム 10ml を得た。このリポソーム液に、20mg のヒト血清アルブミン (HSA) を加えて 25°C で2時間攪拌し、次に PBS (pH 8.0) に 2M NaBH₃CN 100 μ l を加えて 10°C で一晩攪拌してリポソーム上のガングリオシドと HSA とのカップリング反応で HSA を結合した。そして、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過をした後、HSA 結合リポソーム液 10ml を得た。

(6) リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上への tris(hydroxymethyl)aminomethane の結合によるリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理

親水性化試料の一つとしてのリポソームを調製するために、(4)で得たリポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25℃で 2 時間、続いて 7℃で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理リポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に tris(hydroxymethyl) aminomethane (Wako Co., Japan) 13mg を加えて、25℃で 2 時間攪拌し、その後 7℃で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP に tris(hydroxymethyl) aminomethane の結合を行った。その結果、tris(hydroxymethyl) aminomethane とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理をした比較試料としてのリポソーム 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g) が得られた。得られた生理食塩懸濁液中 (37℃) のリポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置 (Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) により測定した結果、粒子径は 50~350nm、ゼータ電位は -30~-10mV であった。

(7) リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上へのセロビオースの結合によるリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理

親水性化試料の一つとしてのリポソームを調製するために、(5)で得たリポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25℃で 2 時間、続いて 7℃で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理リポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液セロビオース 30mg を加えて、25℃で 2 時間攪拌し、その後 7℃で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にセロビオースの結合を行った。その結果、セロビオースとヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理をした親水性化試料の一つとしてのリポソーム 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g) が得られた。得られた生理食塩懸濁液中 (37℃) のリポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置 (Model Nano ZS,

Malvern Instruments Ltd., UK) により測定した結果、粒子径は 50~350nm、ゼータ電位は-30~-10mV であった。

(8) 親水性化処理をしてないリポソームの調製

リポソームはコール酸透析法を用いて調製した。すなわち、ジパルミトイルフオスファチジルコリン、コレステロール、ジセチルフオスフェート、ガングリオシド (糖脂質糖鎖として GT1b を 100%含むもの) をモル比でそれぞれ 35 : 45 : 5 : 15 の割合で合計脂質量 45.6mg になるように混合し、コール酸ナトリウム 46.9mg 添加し、クロロホルム/メタノール溶液 3ml に溶解した。この溶液を蒸発させ、沈殿物を真空中で乾燥させることによって脂質膜を得た。得られた脂質膜を TAPS 緩衝液 (pH8.4) 3ml に懸濁、超音波処理し、透明なミセル懸濁液 3ml を得た。このミセル懸濁液に PBS 緩衝液 (pH7.2) を加えて 10ml にしてから、更に TAPS 緩衝液 (pH8.4) で 3mg/1ml になるよう完全に溶解したドキソルビシンを攪拌しながらゆっくりと滴下して均一に混合した後、このドキソルビシン入りミセル懸濁液を PM10 膜 (AmiconCo., USA) と TAPS 緩衝液 (pH8.4) を用いた限外濾過にかけ均一な親水性化処理をしてないリポソーム粒子懸濁液 10ml を調製した。得られた生理食塩懸濁液中 (37℃) の親水性化処理をしてないリポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置 (Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) により測定した結果、粒子径は 50~350nm、ゼータ電位は-30~-10mV であった。

(9) クロラミン T 法によるリポソームの ^{125}I 標識

クロラミン T (Wako Pure Chemical Co., Japan) 溶液並びに二亜硫酸ナトリウム溶液をそれぞれ 3mg/ml 並びに 5mg/ml となるように用事調製して用いた。実施例 6 から 8 において調製した 3 種のリポソームとを 50 μl ずつ別々にエッペンチューブに入れ、続いて ^{125}I -NaI (NEN Life Science Product, Inc. USA) を 15 μl 、クロラミン T 溶液を 10 μl 加え反応させた。5 分ごとにクロラミン T 溶液 10 μl を加え、この操作を 2 回繰り返した後 15 分後に還元剤として二亜硫酸ナトリウム 100 μl 加え、反応を停止させた。次に、Sephadex G-50 (Pharmacia Biotech. Sweden) カラムクロマト上に乗せ、PBS で溶出、標識体を精製した。最後に、非標識-リポソーム複合体を添加して比活性 (4×10^6 Bq/mg protein) を

調整して3種類の¹²⁵I 標識リポソーム液を得た。

(10) 各種のリポソームの担癌マウスでの血中濃度の測定

Ehrlich ascites tumor (EAT) 細胞 (約 2×10^7 個) を雄性 ddY マウス (7 週齢) 大腿部皮下に移植し、癌組織が 0.3~0.6g に発育 (6~8 日後) したものを本実験に用いた。この担癌マウスに (9) により ¹²⁵I 標識した3種のリポソーム複合体 0.2ml を脂質量として $30 \mu\text{g}$ /一匹の割合となるように尾静脈に注入投与し、5分後に血液を採取し、その放射能をガンマカウンタ (Aloka ARC 300) で測定した。なお、血液への放射能分布量は、投与全放射能に対する血液 1ml 当たりの放射能の割合 (%投与量 /ml 血液) で表示した。図 5 1 に示すとおり、2種類の親水性化処理により血中滞留性が向上するが、とりわけトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンにより親水性化処理をしたリポソームの血中滞留性の向上が顕著であった。

実施例 4 1 ビタミン A 封入リポソームの調製と保存安定性

リポソームはコール酸透析法を用いて調製した。すなわち、ジパルミトイルフォスファチジルコリン、コレステロール、ジセチルフォスフェート、ガングリオシド、スフィンゴミエリン及びジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンをモル比でそれぞれ 35 : 40 : 5 : 5 : 10 : 5 の割合で合計脂質量 45.6mg になるように混合し、コール酸ナトリウム 46.9mg 添加し、クロロホルム/メタノール溶液 3ml に溶解した。この溶液を蒸発させ、沈殿物を真空中で乾燥させることによって脂質膜を得た。得られた脂質膜を PBS 緩衝液 (pH7.2) 3ml に懸濁、超音波処理し、透明なミセル懸濁液 3ml を得た。このミセル懸濁液に PBS 緩衝液 (pH7.2) を加えて 10ml にしてから、更にエタノール 0.3ml と PBS 緩衝液 (pH7.2) 0.7ml を加えて完全に溶解したビタミン A 6mg を攪拌しながらゆっくりと滴下して均一に混合した後、このビタミン A 入りミセル懸濁液を PM10 膜 (AmiconCo., USA) と PBS 緩衝液 (pH7.2) を用いた限外濾過にかけ均一なビタミン A 封入リポソーム (平均粒径 100nm) 10ml を調製した。このビタミン A 封入リポソームは、冷蔵庫中に 1 年間保存した後にも沈殿や凝集を起こすことなく安定であった。

実施例 4 2 ビタミン E 封入リポソームの調製と保存安定性

リポソームはコール酸透析法を用いて調製した。すなわち、ジパルミトイルフ

オスファチジルコリン、コレステロール、ジセチルフosphate、ガングリオシド、スフィンゴミエリン及びジパルミトイルfosファチジルエタノールアミンをモル比でそれぞれ 35 : 40 : 5 : 5 : 10 : 5 の割合で合計脂質量 45.6mg になるように混合し、コール酸ナトリウム 46.9mg を添加、さらにビタミン E6mg も添加し、クロロホルム／メタノール溶液 3ml に溶解した。この溶液を蒸発させ、沈殿物を真空中で乾燥させることによって脂質膜を得た。得られた脂質膜を PBS 緩衝液 (pH7.2) 3ml に懸濁、超音波処理し、透明なミセル懸濁液 3ml を得た。このミセル懸濁液に PBS 緩衝液 (pH7.2) を加えて 10ml にしてから、このビタミン A 入りミセル懸濁液を PM10 膜 (AmiconCo., USA) と PBS 緩衝液 (pH7.2) を用いた限外濾過にかけ均一なビタミン A 封入リポソーム (平均粒径 100nm) 10ml を調製した。このビタミン E 封入リポソームは、冷蔵庫中に 1 年間保存した後にも沈殿や凝集を起こすことなく安定であった。

実施例 4 2 リン酸プレドニゾロン封入リポソームの調製

(1) リン酸プレドニゾロン封入リポソームの調製と封入薬物定量と保存安定性

リポソームはコール酸透析法を用いて調製した。すなわち、ジパルミトイルfosファチジルコリン、コレステロール、ジセチルフosphate、ガングリオシド及びジパルミトイルfosファチジルエタノールアミンをモル比でそれぞれ 35 : 40 : 5 : 15 : 5 の割合で合計脂質量 45.6mg になるように混合し、コール酸ナトリウム 46.9mg 添加し、クロロホルム／メタノール溶液 3ml に溶解した。この溶液を蒸発させ、沈殿物を真空中で乾燥させることによって脂質膜を得た。得られた脂質膜を TAPS 緩衝液 (pH8.4) 3ml に懸濁、超音波処理し、透明なミセル懸濁液 3ml を得た。このミセル懸濁液に PBS 緩衝液 (pH7.2) を加えて 5ml にしてから、更に TAPS 緩衝液 (pH8.4) で 2250mg/6ml になるよう完全に溶解したリン酸プレドニゾロンを攪拌しながらゆっくりと滴下して均一に混合した後、このリン酸プレドニゾロン入りミセル懸濁液を PM10 膜 (AmiconCo., USA) と TAPS 緩衝液 (pH8.4) を用いた限外濾過にかけ均一なリン酸プレドニゾロン封入リポソーム 10ml を調製した。得られた生理食塩懸濁液中 (37℃) のリン酸プレドニゾロン封入リポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置 (Model Nano

ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) により測定した結果、粒子径は 50~350nm、ゼータ電位は -30~-10mV であった。このリポソームの封入薬物量を吸光度 260nm で測定するとおよそ 280 μ g/ml の濃度でリン酸プレドニゾロンが封入されていることがわかった。このリン酸プレドニゾロン封入リポソームは、冷蔵庫中に 1 年間保存した後にも沈殿や凝集を起こすことなく安定であった。

(2) リン酸プレドニゾロン封入リポソーム脂質膜面上の親水性化処理

(1) で調製したリン酸プレドニゾロン封入リポソーム溶液 10ml を XM300 膜 (Amicon Co., USA) と CBS 緩衝液 (pH 8.5) を用いた限外濾過にかけ溶液の pH を 8.5 にした。次に、架橋試薬 bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS3; Pierce Co., USA) 10ml を加え、25°C で 2 時間攪拌した。その後、更に 7°C で一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンと BS3 との化学結合反応を完結した。そして、このリポソーム液を XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過にかけた。次に、CBS 緩衝液 (pH 8.5) 1ml に溶かした tris(hydroxymethyl)aminomethane 40mg をリポソーム液 10ml に加えて、25°C で 2 時間攪拌後、7°C で一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質に結合した BS3 と tris(hydroxymethyl)aminomethane との化学結合反応を完結した。これにより、抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム膜の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン上に tris(hydroxymethyl)aminomethane の水酸基が配位して水和親水性化された。

(3) リン酸プレドニゾロン封入リポソーム膜面上へのヒト血清アルブミン (HSA) の結合

既報の手法 (Yamazaki, N., Kodama, M. and Gabius, H.-J. (1994) *Methods Enzymol.* 242, 56-65) により、カップリング反応法を用いて行った。すなわち、この反応は 2 段階化学反応で行い、まずはじめに、(2) で得られた 10ml のリポソーム膜面上に存在するガングリオシドを 1ml の TAPS 緩衝液 (pH 8.4) に溶かしたメタ過ヨウ素酸ナトリウム 43mg を加えて室温で 2 時間攪拌して過ヨウ素酸酸化した後、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 8.0) で限外濾過することにより酸化されたりポソーム 10ml を得た。このリポソーム液に、20mg のヒト血清アルブミン (HSA) を加えて 25°C で 2 時間攪拌し、次に PBS (pH 8.0) に 2M NaBH₃CN 100 μ l を加えて 10°C

で一晩攪拌してリポソーム上のガングリオシドと HSA とのカップリング反応で HSA を結合した。そして、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過をした後、HSA 結合リン酸プレドニゾロン封入リポソーム液 10ml を得た。

(4) リン酸プレドニゾロン封入リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA) 上へのシアリルルイス X 型四糖鎖の結合とリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理
シアリルルイス X 型四糖鎖 (Calbiochem Co., USA) 50 μ g を 0.25g の NH_4HCO_3 を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37°C で 3 日間攪拌した後、0.45 μ m のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してシアリルルイス X 型四糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を得た。次に、(3) で得たリン酸プレドニゾロン封入リポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25°C で 2 時間、続いて 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記のシアリルルイス X 型四糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を加えて、25°C で 2 時間攪拌し、その後 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP にシアリルルイス X 型四糖鎖の結合を行った。次に、このリポソーム液に tris(hydroxymethyl)aminomethane (Wako Co., Japan) 13mg を加えて、25°C で 2 時間攪拌し、その後 7°C で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP に tris(hydroxymethyl)aminomethane の結合を行った。その結果、tris(hydroxymethyl)aminomethane とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理をしたリポソームを得た。その結果、シアリルルイス X 型四糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理をしたリン酸プレドニゾロン封入リポソーム 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g) が得られた。得られた生理食塩懸濁液中 (37°C) のリン酸プレドニゾロン封入リポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置 (Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) により測定した結果、粒子径は 50~350nm、ゼータ電位は -30~-10mV であった。

(5) リン酸プレドニゾロン封入リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上への tris(hydroxymethyl)aminomethane の結合によるリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理

比較試料としてのリン酸プレドニゾロン封入リポソーム(糖鎖を付けないもの)を調製するために、(3)で得たリン酸プレドニゾロン封入リポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25℃で 2 時間、続いて 7℃で一晩攪拌し、XM300 膜と CBS 緩衝液(pH 8.5)で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理リポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に tris(hydroxymethyl)aminomethane(Wako Co., Japan) 13mg を加えて、25℃で 2 時間攪拌し、その後 7℃で一晩攪拌し、XM300 膜と PBS 緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP に tris(hydroxymethyl)aminomethane の結合を行った。その結果、tris(hydroxymethyl)aminomethane とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理をした比較試料としてのリン酸プレドニゾロン封入リポソーム(糖鎖を付けないもの) 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g) が得られた。得られた生理食塩懸濁液中(37℃)のリン酸プレドニゾロン封入リポソーム粒子(糖鎖を付けないもの)の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置 (Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) により測定した結果、粒子径は 50~350nm、ゼータ電位は-30~-10mV であった。

本実施例で作製したリポソームを以下の実施例 15 および 16 の検討に用いた。
実施例 43 標的指向性リポソームによるリュウマチ性関節炎の治療の検討

(1) RA モデルマウスの作成

RA マウスモデルとしてタイプ II コラーゲン誘導関節炎 (Collagen type II induced arthritis 以下 CIA) モデルを作成した。用いたマウス、試薬類は以下の通りである。

実験動物：DBA/1J マウス (8 週齢、雄)

接種抗原：牛コラーゲン タイプ II

アジュヴァント：結核死菌 (H37Ra, 2 mg/ml) 含有 complete Freund's adjuvant

(CFA), 結核死菌を含まない incomplete Freund's adjuvant (IFA)

コラーゲン水溶液と CFA を容積比 2 : 1 で混和し、100 μ L にコラーゲンを 200 μ g 含有する乳濁液を調整、これをマウスの尾底部皮下へ注射した (Day 0)。処置 21 日後 (Day 21) コラーゲン水溶液と IFA を容積比 2 : 1 で混和し、100 μ L にコラーゲンを 200 μ g 含有する乳濁液を調整し、再度マウス尾底部皮下へ注射した。

処置後 3 回/週の頻度でマウスの四肢を観察、以下の基準によりポイント化して炎症の定量化をした。それぞれの肢において、正常 : 0 ポイント、軽度炎症又は発赤 : 1 ポイント、重度発赤、腫脹又は使用の抑制 : 2 ポイント、手掌、足底部及び関節部の変形 : 3 ポイント (最低は 0 ポイント、最高で 12 ポイントとなる。) このポイントを以下の式で処理して Inflammatory Activity (以下 IA) を求めた。

$$\text{Inflammatory Activity (\%)} = \text{四肢の全てのポイント数} / 12 \times 100$$

以下の結果が得られた。

Day 21 から数日で後肢指に発赤が確認できるマウスが増加してきた。Day 28 でマウスの IA は 16.7% に、Day 39 で 50% に達した。図 5 2 に炎症を起こしたマウスの四肢の写真を提示する。CIA マウス関節炎の所見は以下の通りである。A : 後肢指間関節の腫脹 (第二指、矢印)、B : 後肢指間関節の腫脹 (第四指、矢印)、C : 後肢指間関節の発赤 (矢印)、D : 正常後肢、E : 前肢手関節の腫脹 (矢印)、F : 正常前肢

このように、上記方法により RA マウスモデルとして CIA マウスが作成できた。

(2) RA マウスを DDS の静脈内投与により治療する実験

関節炎を起こしているマウスに治療薬を尾静脈から注射して治療が施行された。静脈注射は Day 28 から Day 46 の期間で週 2 回の頻度であった。

Day 28 で炎症所見のあるマウスを選び、それぞれの群の炎症ポイントの平均が同じになるように 4 群に分けた。それぞれの群は 1) Control : 無治療群、2) free Pred : リン酸プレドニゾロンを生理食塩に溶かした水溶液を使用し、リン酸プレドニゾロンの量が一回 100 μ g、週 200 μ g 静脈注射した群、3) L-Pred : リン酸プレドニゾロンをリポゾームに包埋、糖鎖を付けないものを使用、リン酸プレドニゾロンの量が一回 10 μ g、週 20 μ g 静脈注射した群、4) L-Pred-SLX : リン酸

プレドニゾロンをリポゾームに包埋、シアリルルイス X 糖鎖を結合させたものを使用、リン酸プレドニゾロンの量が一回 $10 \mu\text{g}$ 、週 $20 \mu\text{g}$ 静脈注射した群、の 4 群であった。

この 4 群のマウスの数は Control : 6 匹、free Pred : 7 匹、L-Pred : 8 匹、L-Pred-SLX : 8 匹であった。

以下の結果が得られた。Control では経時的に IA が上昇し、Day 46 の時点で 60%を突破した。free Pred では Day 37 で IA が約 50%に達した後平衡状態で推移した。L-Pred では Day 32 から IA が上昇し始め Day 46 では約 40%であった。L-Pred-SLX では IA の大きな上昇は観察されず、全経過を通して 20%以下であった (図 5 3)。

この結果より以下のことが判明した。

free Pred 群では静脈注射されたリン酸プレドニゾロン量 $100 \mu\text{g}/\text{injection}$ では炎症をコントロールするには不十分であり、Control 群と比して IA は明らかな差は観られなかった。L-Pred 群では静注されたリン酸プレドニゾロン量は free Pred 群の十分の一の $10 \mu\text{g}/\text{injection}$ であったが、IA は free Pred 群と同等かそれ以下であった。これはリン酸プレドニゾロンのリポゾーム化が薬剤の血中滞留性を向上させたことにより、薬効が向上した可能性があると思われた。L-Pred-SLX 群ではリン酸プレドニゾロン量は同様に free Pred 群の十分の一の $10 \mu\text{g}/\text{injection}$ であったが、IA は全く上昇せず炎症の進行は有意に抑制された。これは L-Pred と L-Pred-SLX の差、シアリルルイス X 糖鎖の有無によってもたらされた効果と考えられた。つまりシアリルルイス X 糖鎖によってリポゾームが効果的に炎症部位へ集積した可能性を示していると思われた。

当 DDS は炎症部位へ極めて有効に治療薬を分配できる能力があることが証明された。これは炎症疾患の治療において病巣部に治療薬を集中させることにより、治療薬の持つ副作用を抑制または治療薬の薬効を増大せしめる可能性が示唆されたものである。

(3) RA マウスを DDS の経口投与により治療する実験

関節炎を起こしているマウスに治療薬を経口投与して治療が施行された。投与は Day 28 から Day 39 の期間で週 3 回の頻度であった。

Day 28 で炎症所見のあるマウスを選び、それぞれの群の炎症ポイントの平均がほぼ同じになるように4群に分けた。それぞれの群は1) Control: 無治療群、2) free Pred: リン酸プレドニゾロンを生理食塩に溶かした水溶液を使用し、リン酸プレドニゾロンの量が一回 $100\mu\text{g}$ 、週 $300\mu\text{g}$ 経口投与した群、3) L-Pred: リン酸プレドニゾロンをリポゾームに包埋、糖鎖を付けないものを使用、リン酸プレドニゾロンの量が一回 $10\mu\text{g}$ 、週 $30\mu\text{g}$ 経口投与した群、4) L-Pred-SLX: リン酸プレドニゾロンをリポゾームに包埋、シアリルルイス X 糖鎖を結合させたものを使用、リン酸プレドニゾロンの量が一回 $10\mu\text{g}$ 、週 $30\mu\text{g}$ 経口投与した群、の4群であった。

この4群のマウスの数は Control: 2匹、free Pred: 3匹、L-Pred: 3匹、L-Pred-SLX: 4匹であった。

以下の結果が得られた。

free Pred 群は feeding needle による胃穿孔で死亡したため Day 32 で実験中止された。Control 群、free Pred 群 (Day 32 まで)、L-Pred 群では IA に有意な差は観られなかった。L-Pred-SLX 群は炎症の進行を抑えることはできなかったが、Day 39 で L-Pred に比して IA は有意に低かった (図 5 4)。

この結果より以下のことが判明した。

Control、free Pred そして L-Pred の3群では有意な差がみられていない。これは free Pred 群では経口投与されたリン酸プレドニゾロン $300\mu\text{g/week}$ の量が炎症の進行を抑制するのに不十分であったと推測された。また L-Pred 群ではリポゾームが腸管で吸収されなかったか、吸収されても経口投与されたリン酸プレドニゾロンの量が $30\mu\text{g/week}$ であったことを考えると不十分な量であった可能性が高いと思われた。これに対して L-Pred-SLX 群では IA が抑制されていた。これはリポゾームが腸管で吸収され、しかも経口投与リン酸プレドニゾロン量が $30\mu\text{g/week}$ であることを考えればリン酸プレドニゾロンが糖鎖付きリポゾームのまま炎症部位へ運ばれた可能性を示唆していると思われた。

この結果は当 DDS が静脈内投与だけでなく、経口投与でも有効に機能することを示している。さらにリポゾームに包埋されれば、従来では経口吸収が不可能な薬物からでも経口投与可能な製剤がつくれる可能性を示唆するものである。

(4) RA マウス治療においてリン酸プレドニゾロンの適量を求める実験

関節炎を起こしているマウスに治療薬を尾静脈から注射して治療が行われた。静脈注射は Day 28 から Day 46 の期間で週 2 回の頻度であった。

Day 28 で炎症所見のあるマウスを選び、それぞれの群の炎症ポイントの平均がほぼ同じになるように 3 群に分けた。それぞれの群は 1) Control: 無治療群、2) 250 μ g: リン酸プレドニゾロンを生理食塩に溶かした水溶液を使用、リン酸プレドニゾロンの量が一回 250 μ g、週 500 μ g 静脈注射した群、3) 500 μ g: リン酸プレドニゾロンを生理食塩に溶かした水溶液を使用、リン酸プレドニゾロンの量が一回 500 μ g、週 1000 μ g 静脈注射した群、の 3 群であった。

この 3 群のマウスの数は Control: 2 匹、250 μ g: 2 匹、500 μ g: 2 匹であった。

以下の結果が得られた。

Control 群と 250 μ g 群では有意な差は観られなかった。500 μ g 群では IA の上昇が観られず、炎症の進行は抑制されていた (図 5 5)。

この結果より、以下のことが判明した。当 RA マウスモデルで炎症の進行を抑制するためには最低 500 μ g/week より多く、1000 μ g/week までのリン酸プレドニゾロン量が要求されることが判明した。静脈注射による治療実験では L-Pred-SLX 群が一回 10 μ g、週 20 μ g のリン酸プレドニゾロン量で炎症の進行を抑制したことを考えると、当 DDS では最大 50 分の一の薬物量で従来の治療効果と同様の効果を得ることができる可能性があると考えられた。

これは病巣部での薬剤濃度を維持しながら、全身への投与薬剤量を減らすことが可能で薬剤による副作用を減らすことができるし、また副作用が出現しない濃度まで薬剤の全身投与量を上げれば病巣部の薬剤濃度を上げることができ、さらに高い薬効をえることができる可能性を示している。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

リポソームを構成する組成の種類および量を調節することにより、安定性の高いリポソームを得ることができた。さらに、特定の親水性化合物でリポソームを親水性化することにより、従来のリポソームより優れた安定性等の特性を有するリポソームを得ることができた。

本発明の実施例に示したように、各種糖鎖とヒト血清アルブミン等のヒト由来蛋白質を含む生体由来蛋白質（リンカー）とリポソームとが結合したリポソームを作製し、マウスでの各種組織への体内動態、特に癌組織への取込についてエールリッヒ固形癌担癌マウスを用いて解析した結果、糖鎖の分子構造の差を利用することによって、実際の生体においてリポソームの各種組織への体内動態を促進あるいは抑制して制御することができ、これに基づく効率の良い癌組織をはじめとする目的組織（血中、肝臓、脾臓、肺、脳、小腸、心臓、胸腺、腎臓、膵臓、筋肉、大腸、骨、骨髄、眼、癌組織、炎症組織、リンパ節）へのターゲティング機能をDDS材料に付与することができることが明らかとなった。このように、本発明により、医学・薬学分野において極めて有用な、標的指向性を制御し得るリポソームを提供することができた。また、この際リポソーム表面に結合させる糖鎖密度を制御することにより、より標的指向性の高い糖鎖結合リポソームを得ることができた。

また、本発明の上記糖鎖修飾リポソームは腸管吸収性に優れ、腸管を経由するという、従来のリポソーム使用製剤にはみられない新たな投与形態で投与可能なものであるという点で画期的なものである。さらに、腸管吸収性並びに各種組織（血中、肝臓、脾臓、肺、脳、小腸、心臓、胸腺、腎臓、膵臓、筋肉、大腸、骨、骨髄、眼、癌組織、炎症組織、リンパ節）への体内動態は、リポソームに対する糖鎖結合量の設定と、糖鎖の選択によって制御することができ、これにより、効率的、かつ副作用がなく安全に、薬剤あるいは遺伝子等を腸管そして血中経路で生体組織に移行することが可能となり、医学、薬学分野において特に有用なものである。

さらに、本発明の糖鎖修飾親水性化リポソームおよび糖鎖非修飾親水性化リポソームに、抗癌剤を封入し癌を担持する被験体に経口または非経口で投与した場合、癌組織に標的指向的に集積し、癌の成長を抑制することができる。

本発明の標的指向性リポソームは、適切な医薬効果を有する化合物を封入することにより、体内でリポソーム表面に結合している糖鎖が認識・結合し得るレクチンを発現している組織・器官に到達し細胞に取り込まれ、そこで医薬効果を有する化合物がその効果を発揮し、治療薬および診断薬として用いることができる。特に抗癌剤を封入し、癌治療薬として用いることができる。また、本発明の腸管吸収制御性リポソームは腸管から容易に吸収され、その後標的指向性リポソームと同様に体内で封入された医薬効果を有する物質がその効果を迅速に発揮し得る。

請求の範囲

1. 糖鎖がリポソーム膜に結合されている糖鎖修飾リポソーム。
2. リポソームの構成脂質が、フォスファチジルコリン類(モル比0～70%)、フォスファチジルエタノールアミン類(モル比0～30%)、フォスファチジン酸類、長鎖アルキルリン酸塩類およびジセチルリン酸類からなる群から選択される1種以上の脂質(モル比0～30%)、ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類およびスフィンゴミエリン類からなる群から選択される1種以上の脂質(モル比0～40%)、ならびにコレステロール類(モル比0～70%)を含む、請求項1記載の糖鎖修飾リポソーム。
3. ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類、スフィンゴミエリン類およびコレステロール類からなる群から選択される少なくとも1種の脂質がリポソーム表面上で集合シラフトを形成している請求項2記載の糖鎖修飾リポソーム。
4. 糖鎖の種類および密度が制御されて結合されている、請求項1から3のいずれか1項に記載の糖鎖修飾リポソーム。
5. リポソームの粒径が30～500nmである、請求項1から4のいずれか1項に記載の糖鎖修飾リポソーム。
6. リポソームの粒径が50～350nmである、請求項5記載の糖鎖修飾リポソーム。
7. リポソームのゼータ電位が-50～10mVである、請求項1から6のいずれか1項に記載の糖鎖修飾リポソーム。
8. リポソームのゼータ電位が-40～0mVである、請求項7記載の糖鎖修飾リポソーム。
9. リポソームのゼータ電位が-30～-10mVである、請求項8記載の糖鎖修飾リポソーム。
10. 糖鎖がリンカー蛋白質を介してリポソーム膜に結合されている、請求項1から9のいずれか1項に記載の糖鎖修飾リポソーム。
11. リンカー蛋白質が生体由来蛋白質である請求項10記載の糖鎖修飾リ

ポソーム。

12. リンカー蛋白質がヒト由来蛋白質である請求項11記載の糖鎖修飾リポソーム。

13. リンカー蛋白質がヒト由来血清蛋白質である請求項12記載の糖鎖修飾リポソーム。

14. リンカー蛋白質がヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンである請求項11記載の糖鎖修飾リポソーム。

15. リンカー蛋白質がリポソーム表面上に形成されているガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類、スフィンゴミエリン類およびコレステロール類からなる群から選択される少なくとも1種の脂質からなるラフト上に結合している請求項1から14のいずれか1項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

16. リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質に親水性化合物が結合することにより親水性化されている、請求項1から15のいずれか1項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

17. 親水性化合物が低分子物質である、請求項16記載の糖鎖修飾リポソーム。

18. 親水性化合物が糖鎖に対する立体障害となりにくく標的細胞膜面上のレクチンによる糖鎖分子認識反応の進行を妨げない、請求項16または17記載の糖鎖修飾リポソーム。

19. 親水性化合物が水酸基を有する請求項16から18のいずれか1項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

20. 親水性化合物がアミノアルコール類である請求項16から19のいずれか1項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

21. 親水性化合物がリポソーム膜表面に直接結合している請求項16から20のいずれか1項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

22. 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式(1)
$$X-R1(R2OH)_n$$
 式(1)

で示される請求項16記載の糖鎖修飾リポソームであって、R1は、C1からC40

の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R2 は存在しないかもしくは C1 から C40 の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、X はリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、n は自然数を示す、糖鎖修飾リポソーム。

23. 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式 (2)
 $H_2N-R3-(R4OH)_n$ 式 (2)

で示される請求項 16 記載の糖鎖修飾リポソームであって、R3 は、C1 から C40 の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R4 は存在しないかもしくは C1 から C40 の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 H_2N はリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、n は自然数を示す、糖鎖修飾リポソーム。

24. 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式 (3)
 $H_2N-R5(OH)_n$ 式 (3)

で示される請求項 16 記載の糖鎖修飾リポソームであって、R5 は、C1 から C40 の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 H_2N はリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、n は自然数を示す、糖鎖修飾リポソーム。

25. リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質にトリス (ヒドロキシアルキル) アミノアルカンである親水性化合物を共有結合により結合させることによりリポソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、請求項 16 記載の糖鎖修飾リポソーム。

26. リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質にトリス (ヒドロキシメチル) アミノエタン、トリス (ヒドロキシエチル) アミノエタン、トリス (ヒドロキシプロピル) アミノエタン、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、トリス (ヒドロキシエチル) アミノメタン、トリス (ヒドロキシプロピル) アミノメタン、トリス (ヒドロキシメチル) アミノプロパン、トリス (ヒドロキシエチル) アミノプロパン、トリス (ヒドロキシプロピル) アミノプロパンからなる群から選択される親水性化合物を共有結合により結合させることによりリポソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、請求項 25 記載の糖鎖

修飾リポソーム。

27. 糖鎖修飾リポソームが、各組織の細胞膜面上に存在するレセプターとしてのセレクトイン、DC-SIGN、DC-SIGNR、コレクチンおよびマンノース結合レクチンを含むC-タイプレクチン、シグレックを含むIタイプレクチン、マンノース-6-リン酸受容体を含むPタイプレクチン、Rタイプレクチン、Lタイプレクチン、Mタイプレクチン、ガレクチンからなる群から選択されるレクチンを標的とする請求項1から26のいずれか1項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

28. 糖鎖修飾リポソームがE-セレクトイン、P-セレクトインおよびL-セレクトインからなる群から選択されるセレクトインを標的とする請求項28記載の糖鎖修飾リポソーム。

29. リポソームに結合した糖鎖の結合密度が、リンカー蛋白質を用いる場合は、リポソーム1粒子当たり1～30000個であり、リンカー蛋白質を用いない場合は、リポソーム1粒子当たり最高1～500000個である、請求項1から28のいずれか1項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

30. リポソームに結合した糖鎖の結合密度が、リポソームに結合させる蛋白質1分子当たり1～60個である、請求項1から28のいずれか1項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

31. リポソームが腸管吸収機能を有するものである請求項1から30のいずれか1項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

32. 血中、肝臓、脾臓、肺、脳、小腸、心臓、胸腺、腎臓、膵臓、筋肉、大腸、骨、骨髄、眼、癌組織、炎症組織およびリンパ節からなる群から選択される組織または器官に指向性の高い、請求項1から31のいずれか1項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

33. 糖鎖がリポソーム膜に結合されているものであって、糖鎖が、アルファ1,2マンノビオース二糖鎖、アルファ1,3マンノビオース二糖鎖、アルファ1,4マンノビオース二糖鎖、アルファ1,6マンノビオース二糖鎖、アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖、オリゴマンノース3五糖鎖、オリゴマンノース4b六糖鎖、オリゴマンノース5七糖鎖、オリゴマンノース6八糖鎖、オリゴマンノース7九糖鎖、オリゴマンノース8十糖鎖、オリゴマンノース9十一糖鎖、

3'-シアリルラクトース三糖鎖、6'-シアリルラクトース三糖鎖、3'-シアリルラクトサミン三糖鎖、6'-シアリルラクトサミン三糖鎖、ルイス X 型三糖鎖、シアリルルイス X 型四糖鎖、ラクトース二糖鎖、2'-フコシルラクトース三糖鎖、ジフコシルラクトース四糖鎖および 3-フコシルラクトース三糖鎖からなる群から選択される、請求項 1 から 32 のいずれか 1 項に記載の糖鎖修飾リボソーム。

34. 請求項 1 から 33 のいずれか 1 項に記載のリボソームに薬剤または遺伝子を封入したリボソーム製剤。

35. 薬剤が、アルキル化系抗癌剤、代謝拮抗剤、植物由来抗癌剤、抗癌性抗生物質、BRM・サイトカイン類、白金錯体系抗癌剤、免疫療法剤、ホルモン系抗癌剤、モノクローナル抗体等の腫瘍用薬剤、中枢神経用薬剤、末梢神経系・感覚器官用薬剤、呼吸器疾患治療薬剤、循環器用薬剤、消化器官用薬剤、ホルモン系用薬剤、泌尿器・生殖器用薬剤、外用薬剤、ビタミン・滋養強壮剤、血液・体液用薬剤、代謝性医薬品、抗生物質・化学療法薬剤、検査用薬剤、抗炎症剤、眼疾患薬剤、中枢神経系薬剤、自己免疫系薬剤、循環器系薬剤、糖尿病、高脂血症等の生活習慣病薬剤または経口、経肺、経皮膚もしくは経粘膜のための各種薬剤、副腎皮質ホルモン、免疫抑制剤、抗菌薬、抗ウイルス薬、血管新生抑制剤、サイトカインやケモカイン、抗サイトカイン抗体や抗ケモカイン抗体、抗サイトカイン・ケモカイン受容体抗体、siRNA、miRNA、smRNA、アンチセンス ODN や DNA などの遺伝子治療関連の核酸製剤、神経保護因子、抗体医薬からなる群から選択される請求項 34 記載のリボソーム製剤。

36. 経口投与用製剤である、請求項 34 または 35 に記載のリボソーム製剤。

37. 非経口投与用製剤である、請求項 34 または 35 に記載のリボソーム製剤。

38. 糖鎖修飾リボソームを含む薬剤が、ドキソルビシンである請求項 35 記載のリボソーム製剤。

39. 薬剤が腫瘍用薬剤である、請求項 35 記載のリボソーム製剤を含む抗癌剤。

40. 経口投与用抗癌剤である、請求項 39 記載の抗癌剤。

4 1. 非経口投与用抗癌剤である、請求項 3 9 記載の抗癌剤。

4 2. リポソーム膜が親水性化されており、表面に糖鎖が結合していないリポソーム。

4 3. リポソームの構成脂質が、フォスファチジルコリン類(モル比 0 ~ 70%)、フォスファチジルエタノールアミン類(モル比 0 ~ 30%)、フォスファチジン酸類、長鎖アルキルリン酸塩類およびジセチルリン酸類からなる群から選択される 1 種以上の脂質 (モル比 0 ~ 30%)、ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類およびスフィンゴミエリン類からなる群から選択される 1 種以上の脂質 (モル比 0 ~ 40%)、ならびにコレステロール類 (モル比 0 ~ 70%) を含む、請求項 4 2 記載のリポソーム。

4 4. さらに、蛋白質を含む請求項 4 2 または 4 3 に記載のリポソーム。

4 5. リポソーム膜および/またはリンカー蛋白質に親水性化合物が結合することにより親水性化されている、請求項 4 2 から 4 4 のいずれか 1 項に記載のリポソーム。

4 6. 親水性化合物が低分子物質である、請求項 4 5 記載のリポソーム。

4 7. 親水性化合物が糖鎖に対する立体障害となりにくく標的細胞膜面上のレクチンによる糖鎖分子認識反応の進行を妨げない、請求項 4 5 または 4 6 記載のリポソーム。

4 8. 親水性化合物が水酸基を有する請求項 4 5 から 4 7 のいずれか 1 項に記載のリポソーム。

4 9. 親水性化合物がアミノアルコール類である請求項 4 5 から 4 8 のいずれか 1 項に記載のリポソーム。

5 0. 親水性化合物がリポソーム膜表面に直接結合している請求項 4 5 から 4 9 のいずれか 1 項に記載のリポソーム。

5 1. 低分子の親水性化合物が少なくとも 1 つの OH 基を有する化合物である、請求項 4 5 記載のリポソーム。

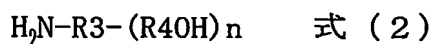
5 2. 親水性化合物が、一般式 (1)

$X-R1(R2OH)_n$ 式 (1)

で示される請求項 4 5 記載のリポソームであって、R1 は、C1 から C40 の直鎖また

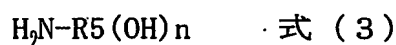
は分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R2 は存在しないかもしくは C1 から C40 の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、X はリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、n は自然数を示す、リポソーム。

5 3. 親水性化合物が、一般式 (2)



で示される請求項 4 5 記載のリポソームであって、R3 は、C1 から C40 の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R4 は存在しないかもしくは C1 から C40 の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、H₂N はリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、n は自然数を示す、リポソーム。

5 4. 親水性化合物が、一般式 (3)



で示される請求項 4 5 記載のリポソームであって、R5 は、C1 から C40 の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、H₂N はリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、n は自然数を示す、リポソーム。

5 5. リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質にトリス (ヒドロキシアルキル) アミノアルカンである親水性化合物を共有結合により結合させることによりリポソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、請求項 4 5 記載のリポソーム。

5 6. リポソーム膜にトリス (ヒドロキシメチル) アミノエタン、トリス (ヒドロキシエチル) アミノエタン、トリス (ヒドロキシプロピル) アミノエタン、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、トリス (ヒドロキシエチル) アミノメタン、トリス (ヒドロキシプロピル) アミノメタン、トリス (ヒドロキシメチル) アミノプロパン、トリス (ヒドロキシエチル) アミノプロパン、トリス (ヒドロキシプロピル) アミノプロパンからなる群から選択される親水性化合物を共有結合により結合させることによりリポソーム膜が親水性化されている、請求項 5 5 記載のリポソーム。

57. 請求項42から56のいずれか1項に記載のリポソームに薬剤または遺伝子を封入したリポソーム製剤。

58. 薬剤が、アルキル化系抗癌剤、代謝拮抗剤、植物由来抗癌剤、抗癌性抗生物質、BRM・サイトカイン類、白金錯体系抗癌剤、免疫療法剤、ホルモン系抗癌剤、モノクローナル抗体等の腫瘍用薬剤、中枢神経用薬剤、末梢神経系・感覚器官用薬剤、呼吸器疾患治療薬剤、循環器用薬剤、消化器官用薬剤、ホルモン系用薬剤、泌尿器・生殖器用薬剤、外用薬剤、ビタミン・滋養強壮剤、血液・体液用薬剤、代謝性医薬品、抗生物質・化学療法薬剤、検査用薬剤、抗炎症剤、眼疾患薬剤、中枢神経系薬剤、自己免疫系薬剤、循環器系薬剤、糖尿病、高脂血症等の生活習慣病薬剤または経口、経肺、経皮膚もしくは経粘膜のための各種薬剤、副腎皮質ホルモン、免疫抑制剤、抗菌薬、抗ウイルス薬、血管新生抑制剤、サイトカインやケモカイン、抗サイトカイン抗体や抗ケモカイン抗体、抗サイトカイン・ケモカイン受容体抗体、siRNA、miRNA、smRNA、アンチセンス、ODNやDNAなどの遺伝子治療関連の核酸製剤、神経保護因子、抗体医薬からなる群から選択される請求項57記載のリポソーム製剤。

59. 経口投与用製剤である、請求項57または58に記載のリポソーム製剤。

60. 非経口投与用製剤である、請求項57または58に記載のリポソーム製剤。

61. 薬剤が腫瘍用薬剤である、請求項58記載のリポソーム製剤を含む抗癌剤。

62. 糖鎖修飾リポソームを含む薬剤が、ドキソルビシンである請求項61記載のリポソーム製剤。

63. 経口投与用抗癌剤である、請求項61または62に記載の抗癌剤。

64. 非経口投与用抗癌剤である、請求項61または62に記載の抗癌剤。

65. 請求項1から33のいずれか1項に記載の糖鎖修飾リポソームに化粧品を封入したリポソーム製剤を含む化粧品組成物。

66. 経皮投与製剤である請求項65記載の化粧品組成物。

67. 化粧品が、ビタミンAまたはビタミンEである請求項65または66

に記載の化粧品組成物。

68. 請求項1から33のいずれか1項に記載の糖鎖修飾リポソームに食品を封入したリポソーム製剤を含む食品組成物。

69. 経口投与製剤である請求項68記載の食品組成物。

70. 食品が栄養補助食品である請求項68または69に記載の食品組成物。

71. 食品が、ビタミンAまたはビタミンEである請求項69または70に記載の食品組成物。

72. 請求項42から56のいずれか1項に記載のリポソームに化粧品を封入したリポソーム製剤を含む化粧品組成物。

73. 経皮投与製剤である請求項72記載の化粧品組成物。

74. 化粧品が、ビタミンAまたはビタミンEである請求項72または73に記載の化粧品組成物。

75. 請求項42から56のいずれか1項に記載のリポソームに食品を封入したリポソーム製剤を含む食品組成物。

76. 経口投与製剤である請求項75記載の食品組成物。

77. 食品が栄養補助食品である請求項75または76に記載の食品組成物。

78. 食品が、ビタミンAまたはビタミンEである請求項76または77に記載の食品組成物。

図1

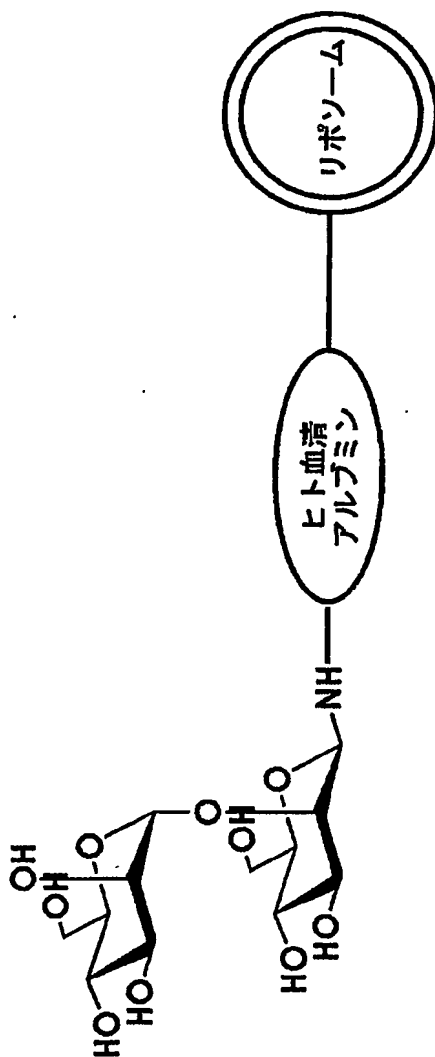
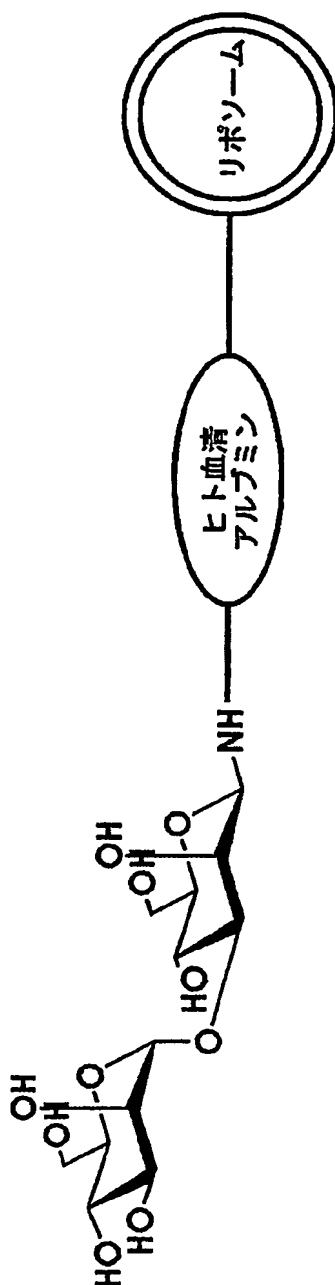
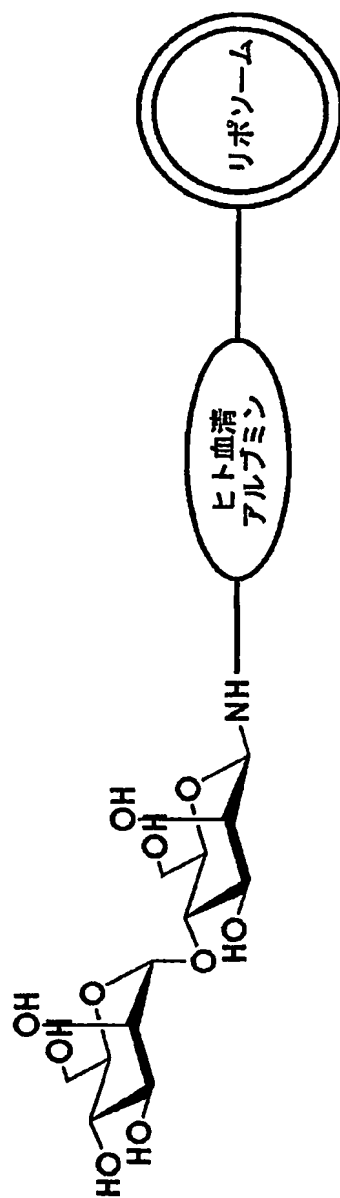
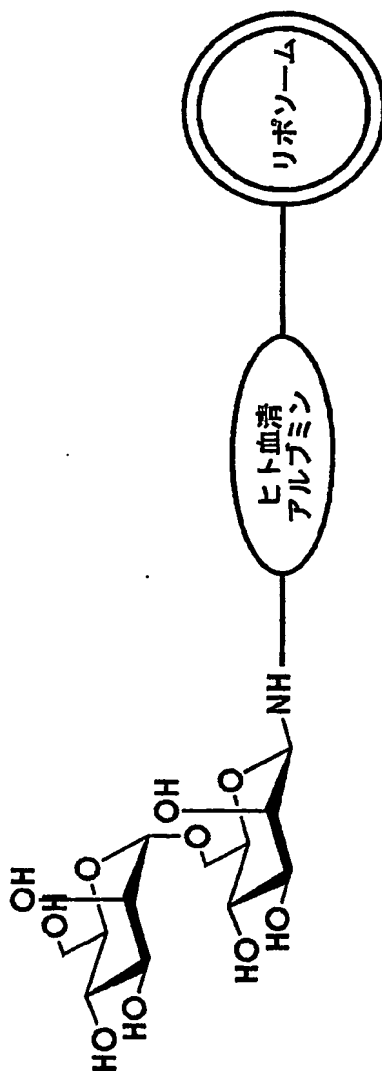


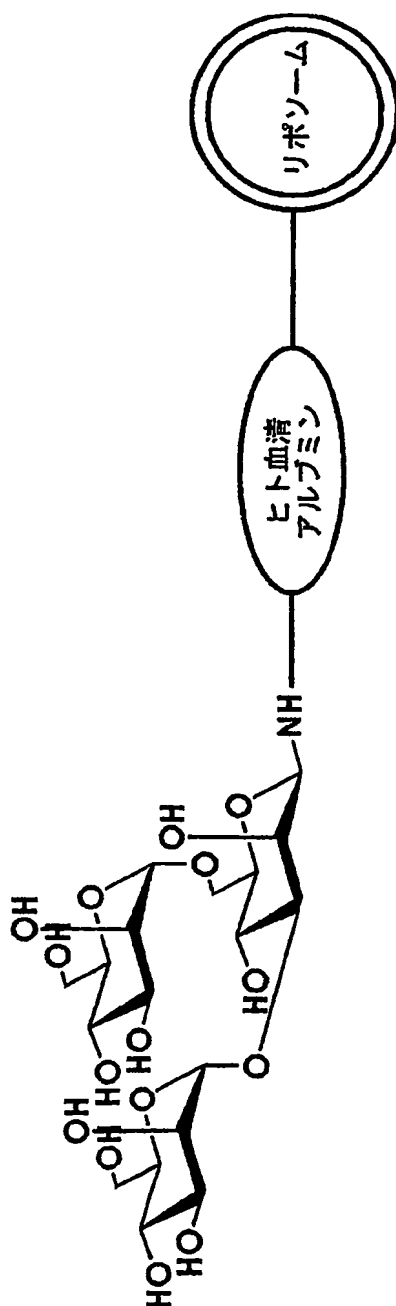
図 2







55



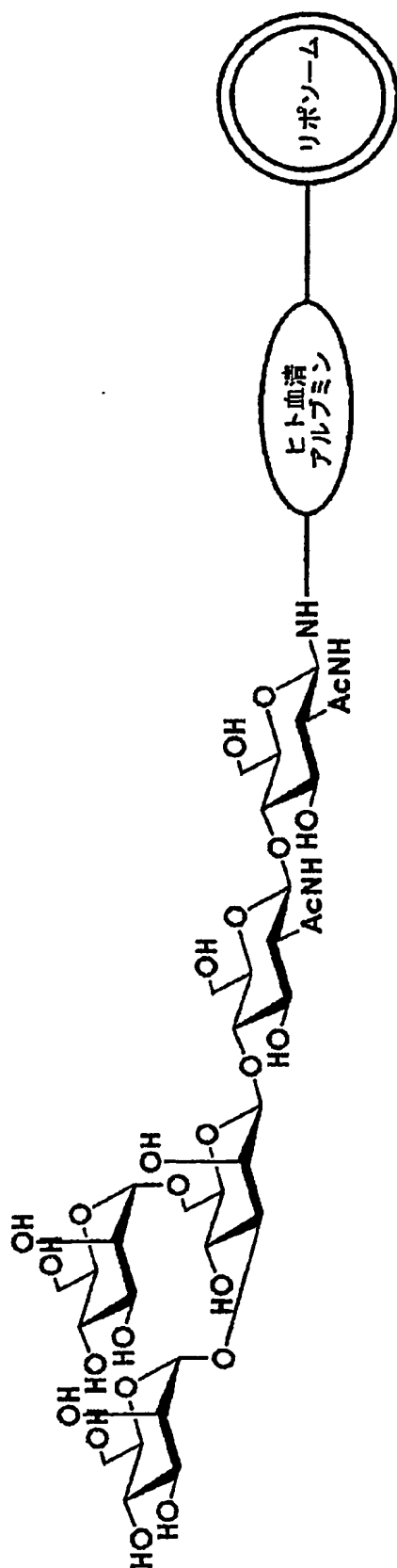
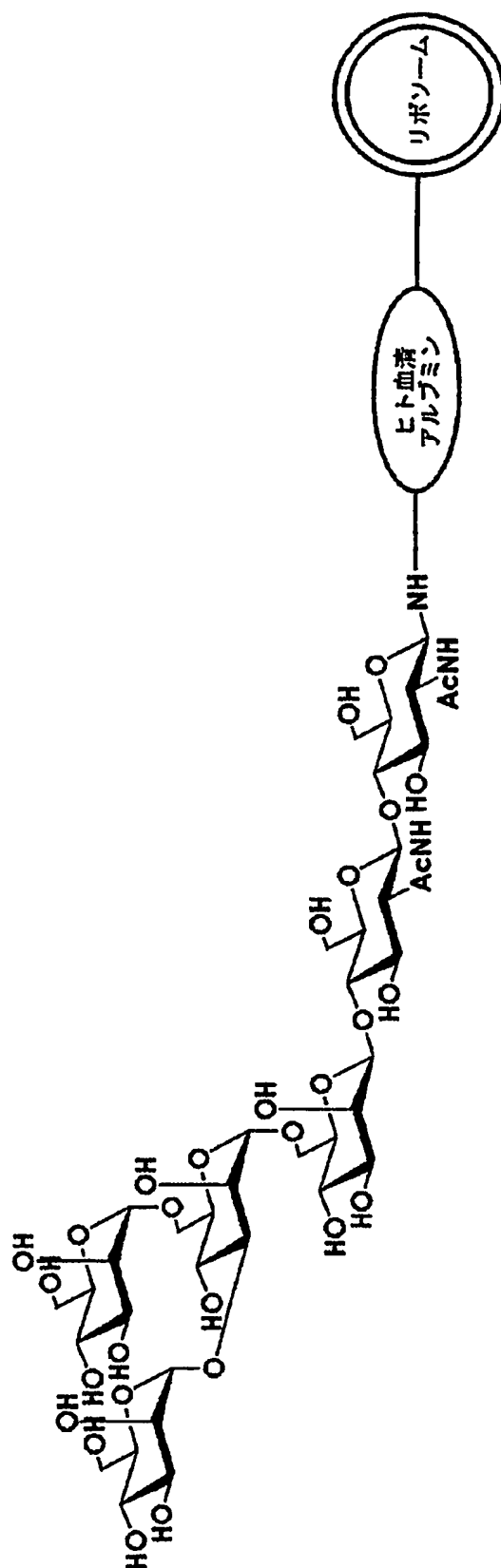


図 7



8

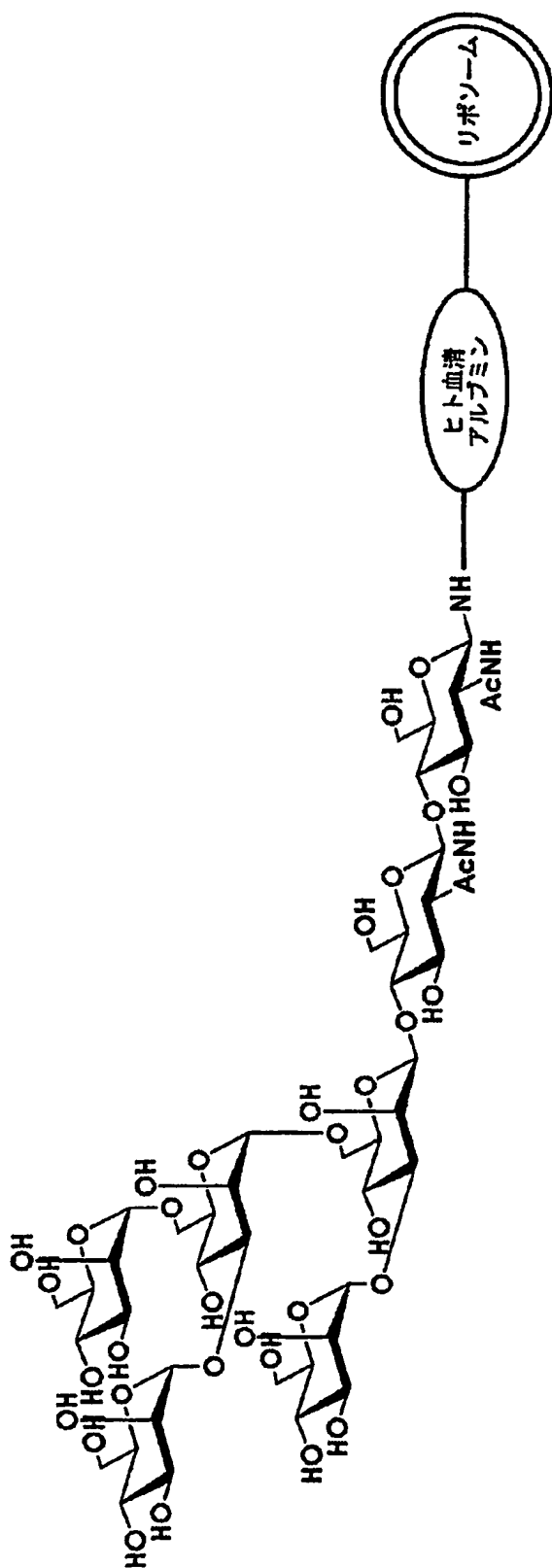


図 9

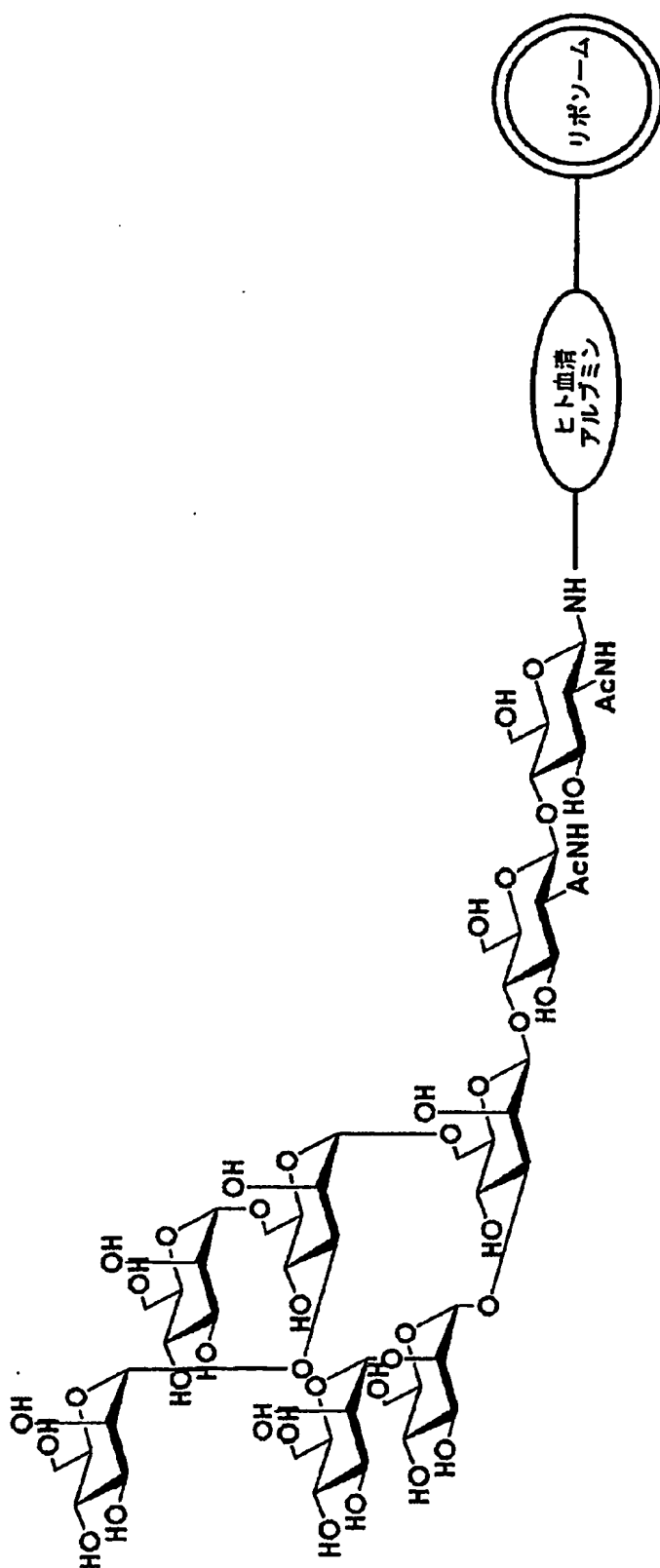


図10

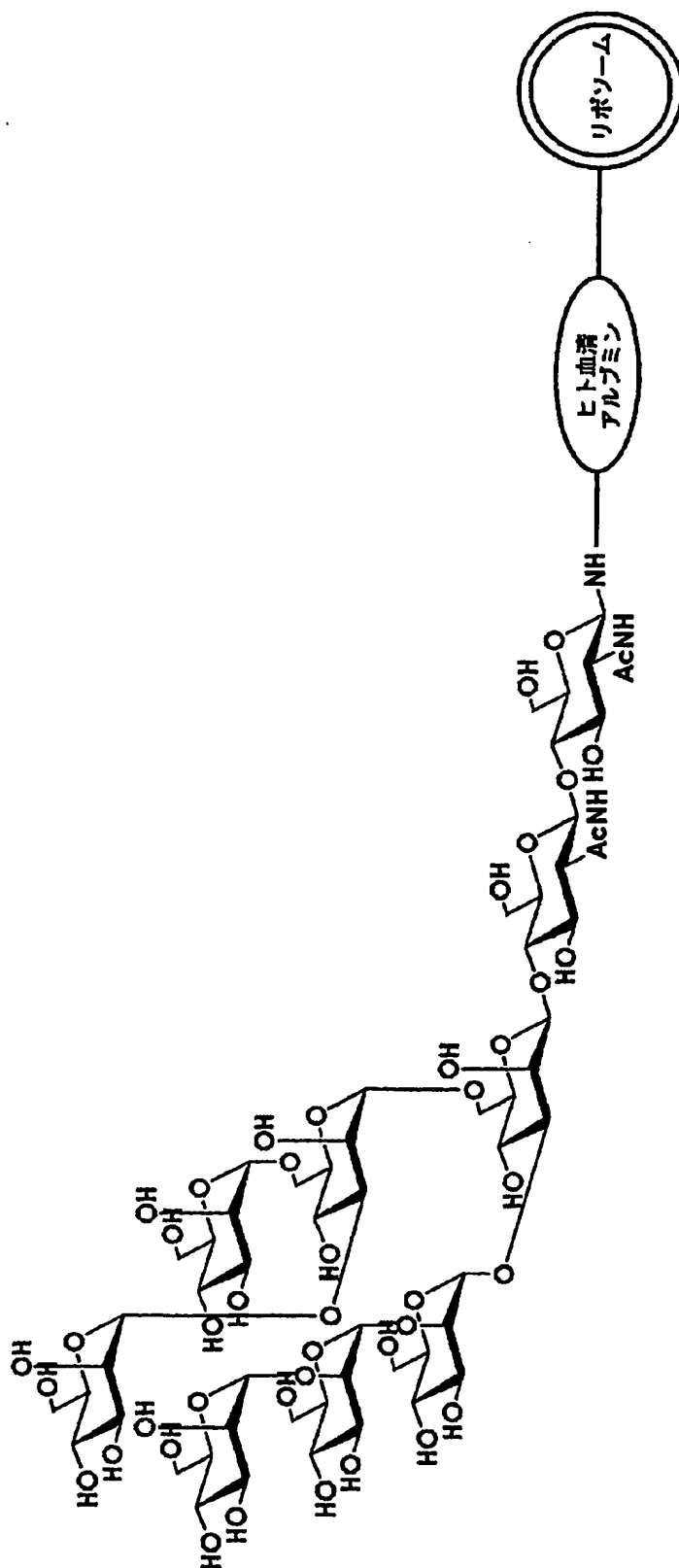


図 11

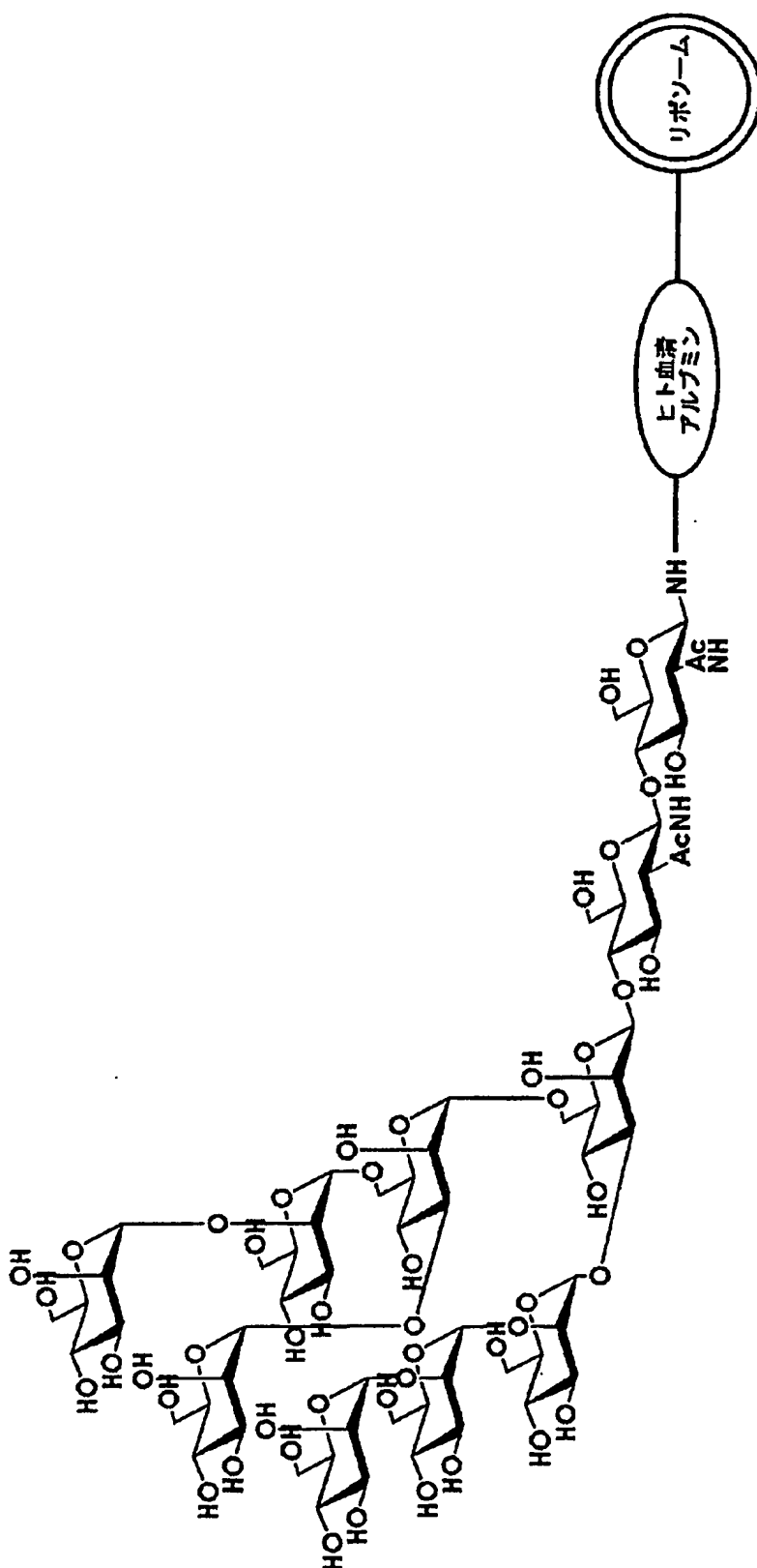
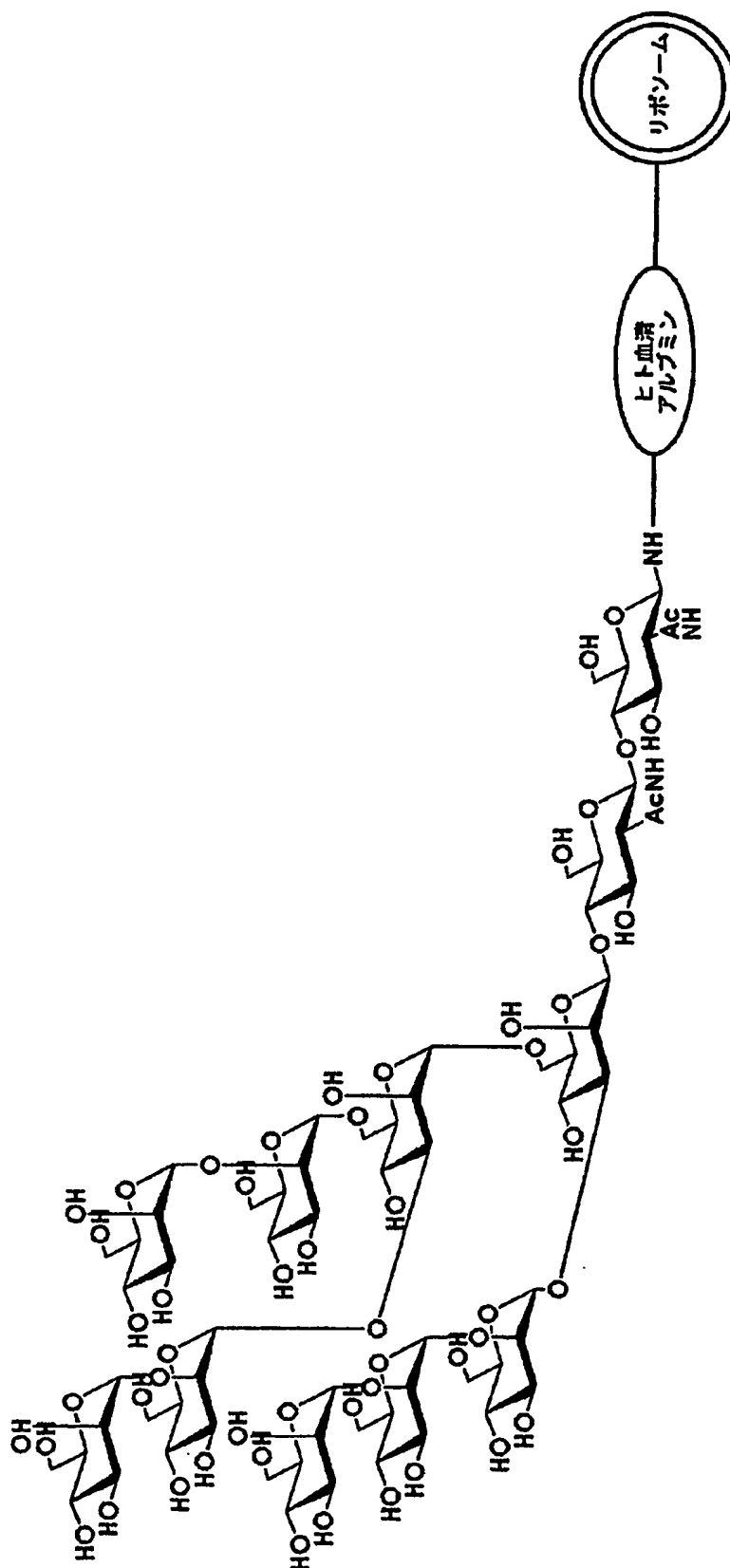
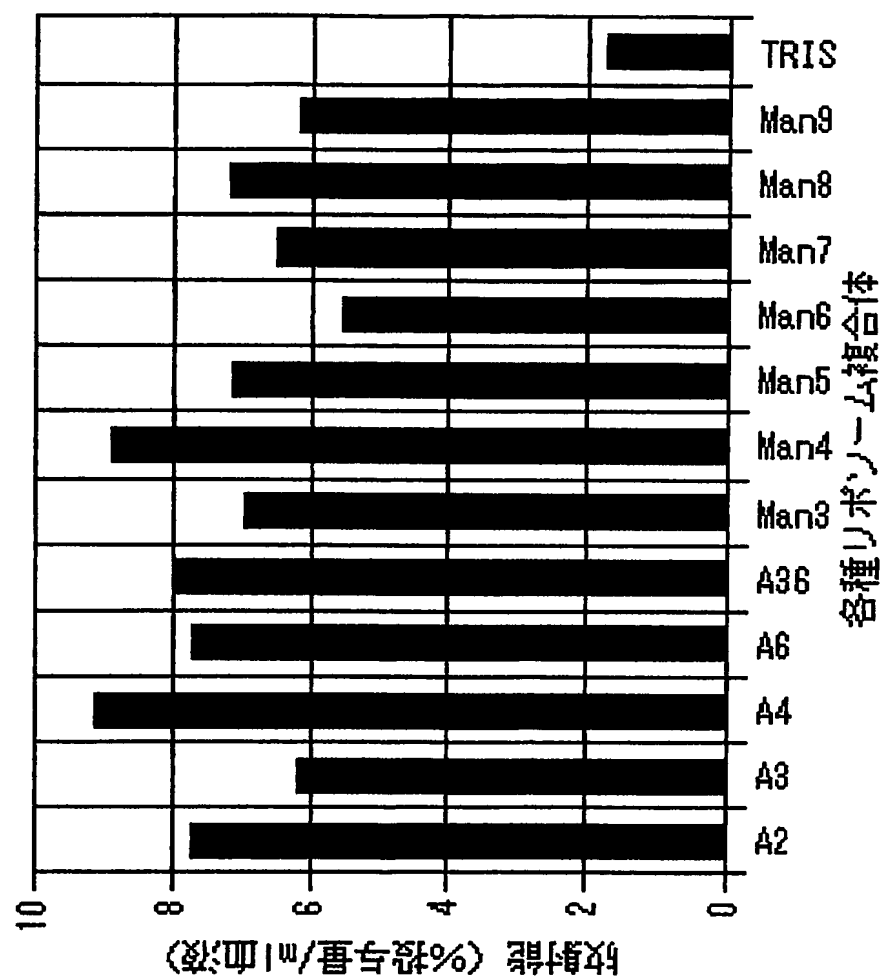
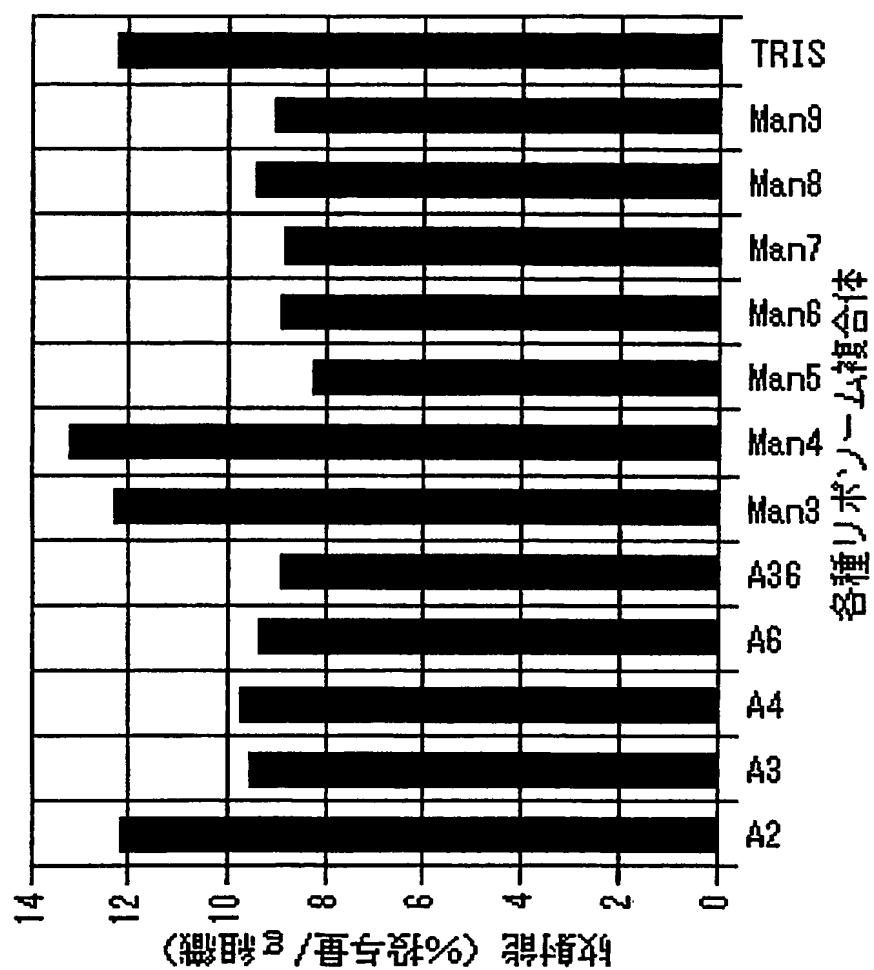
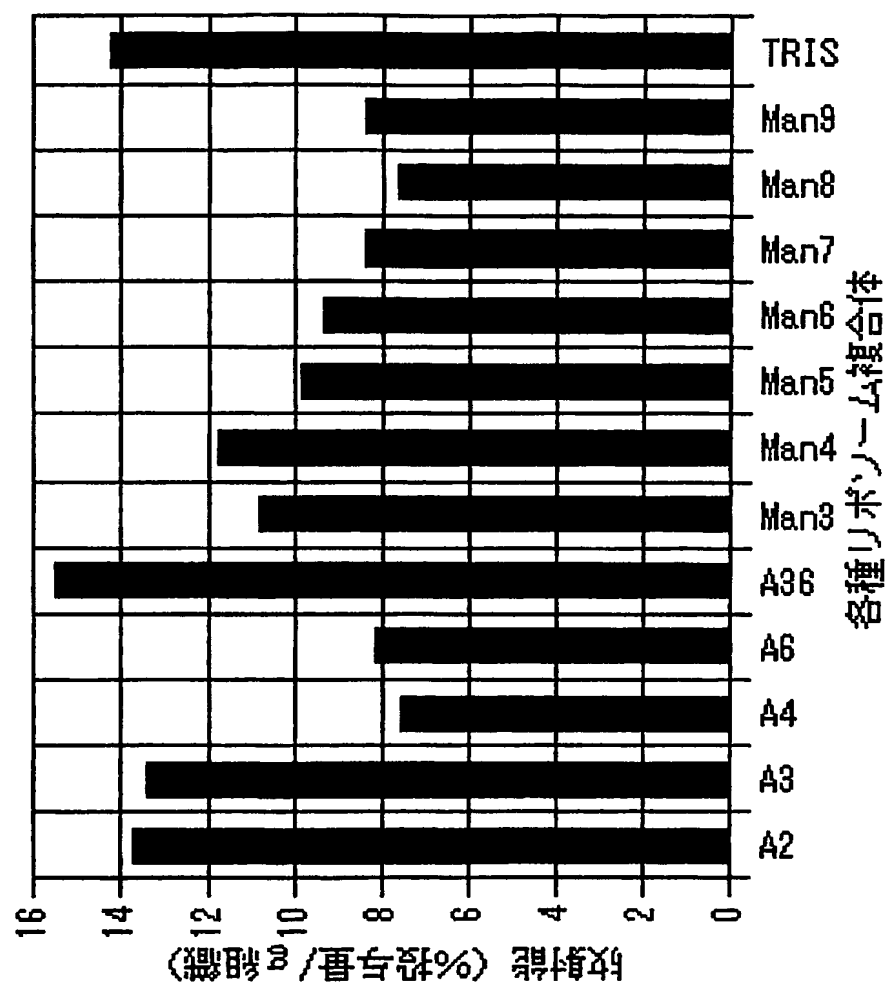


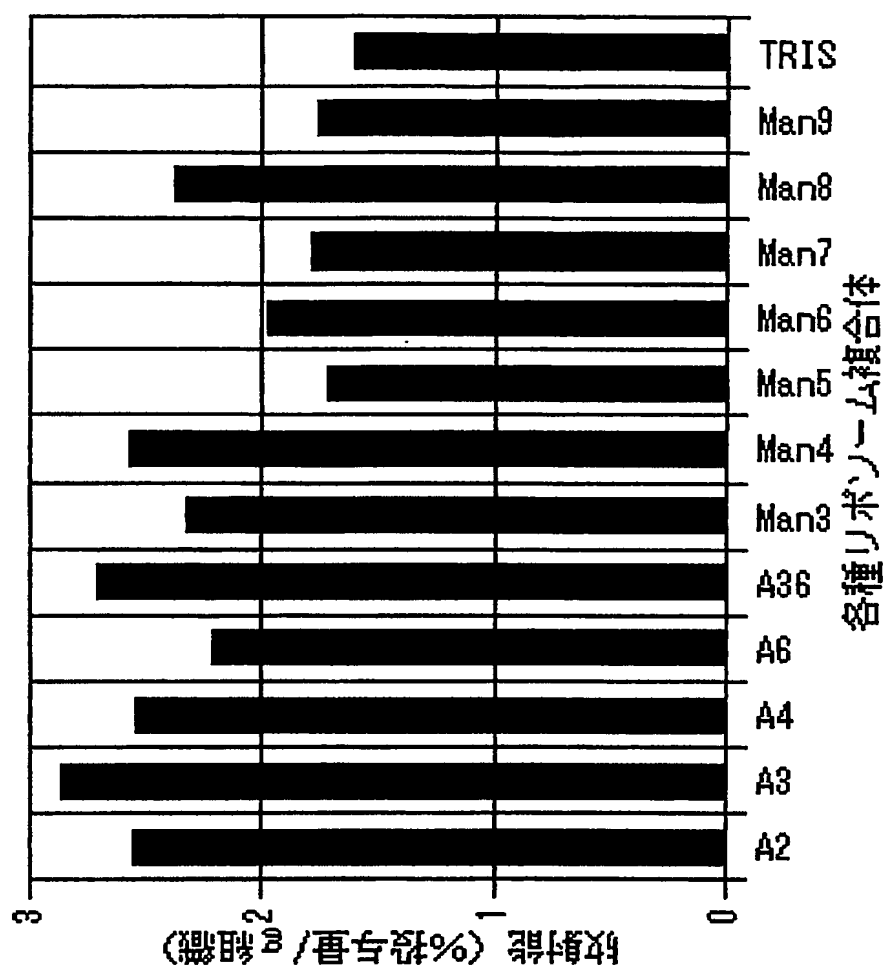
図 12

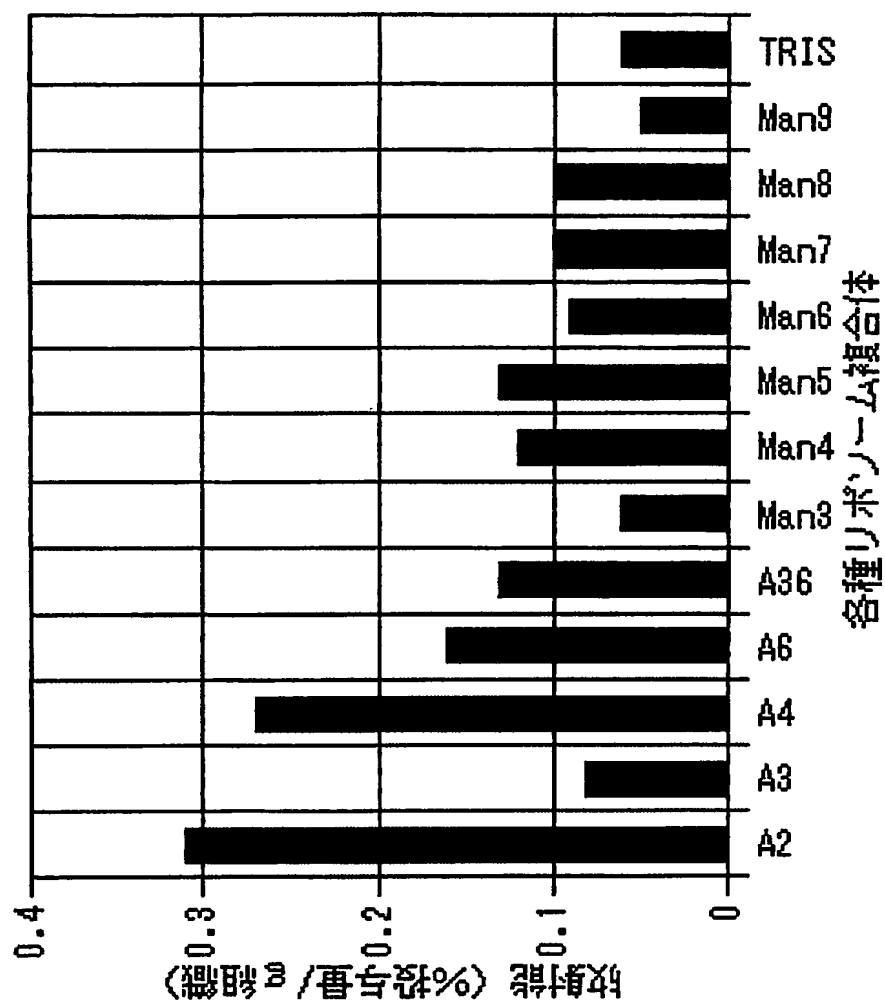


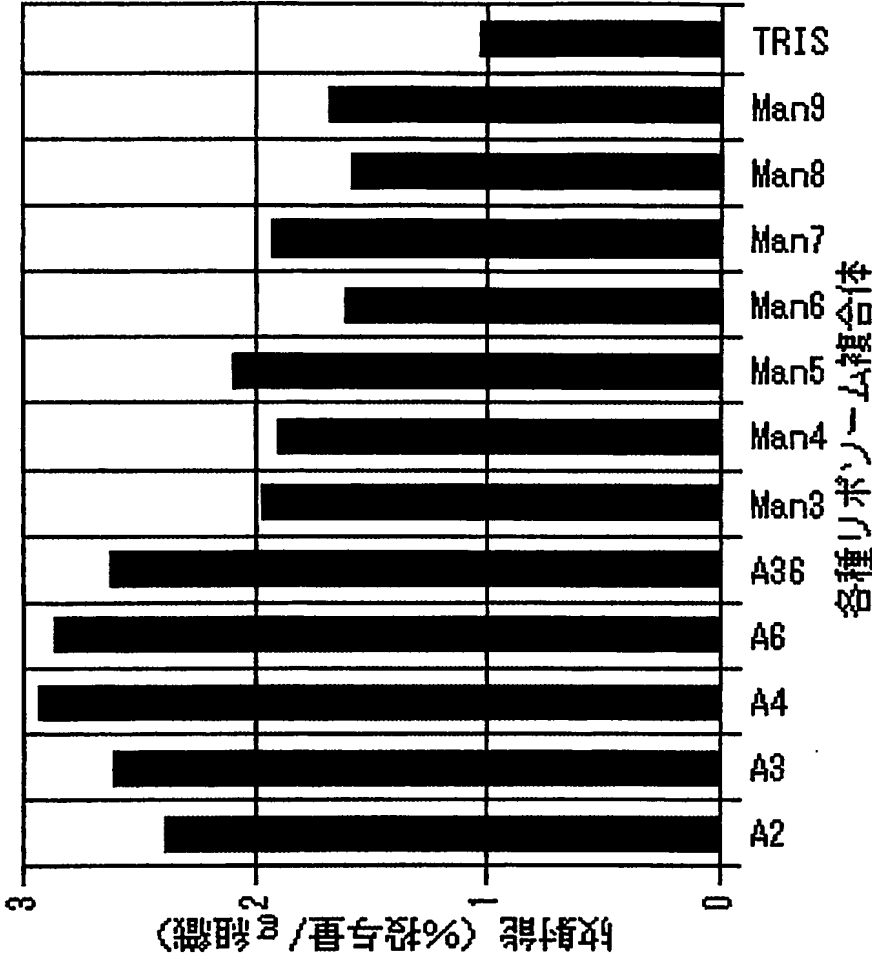


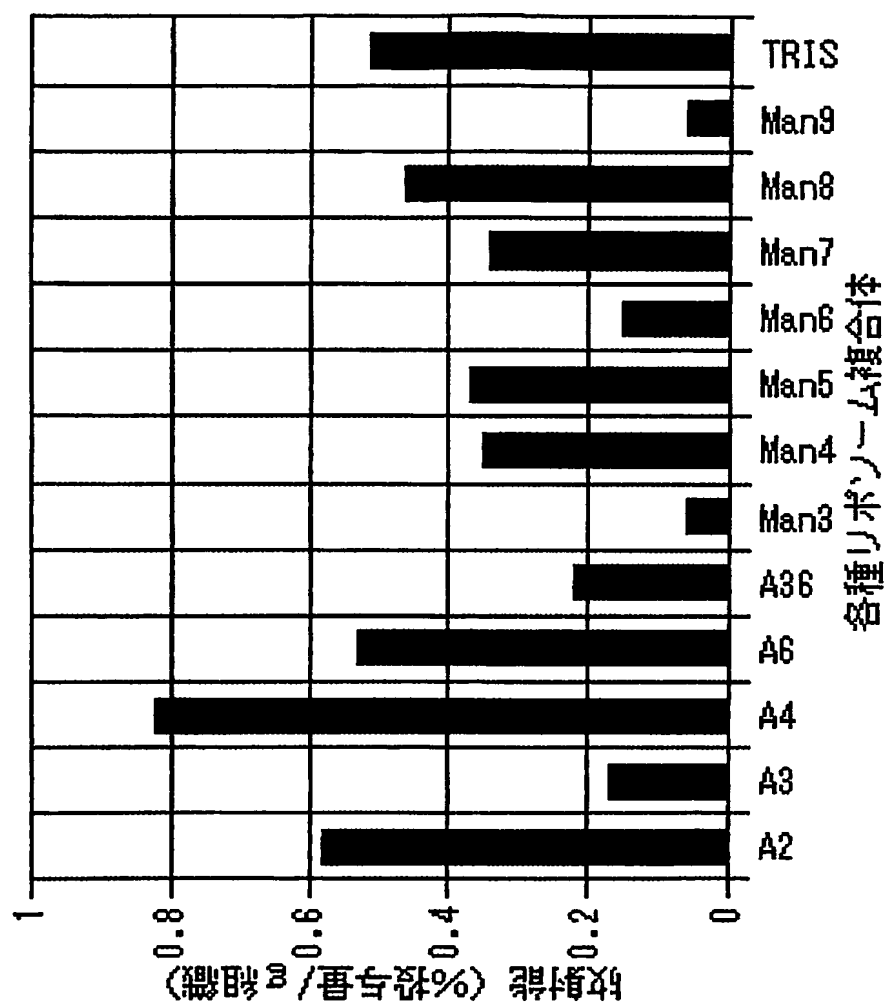


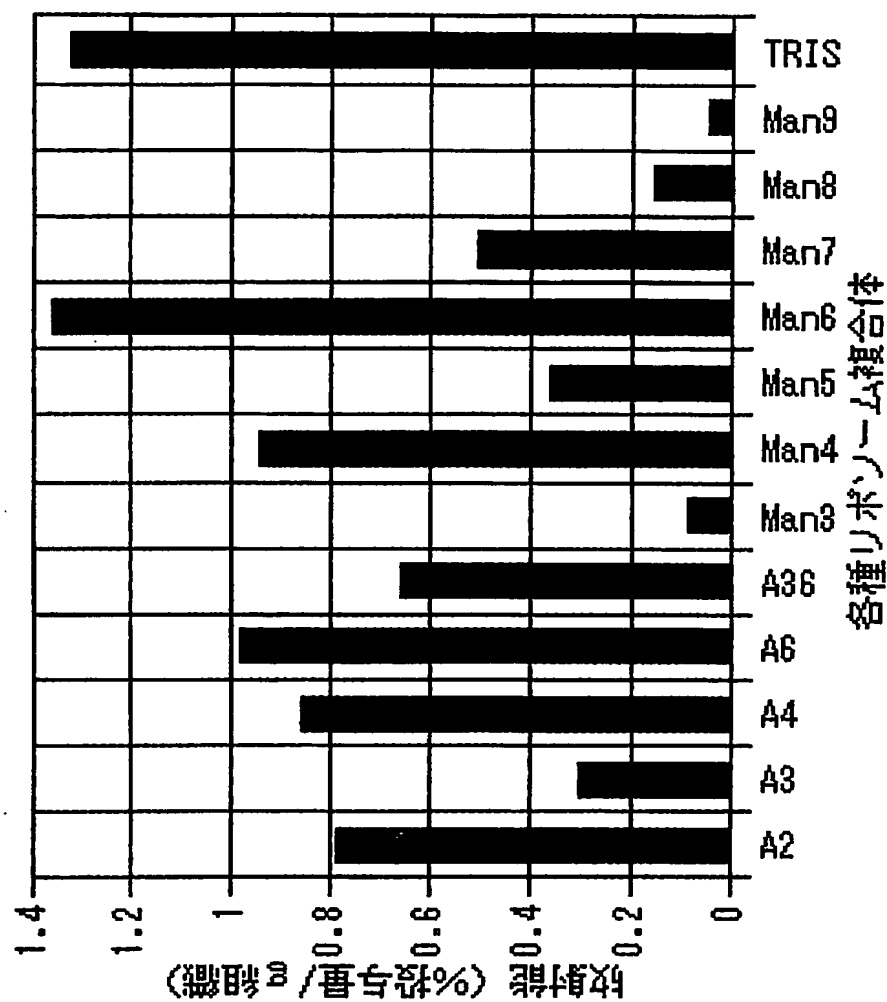


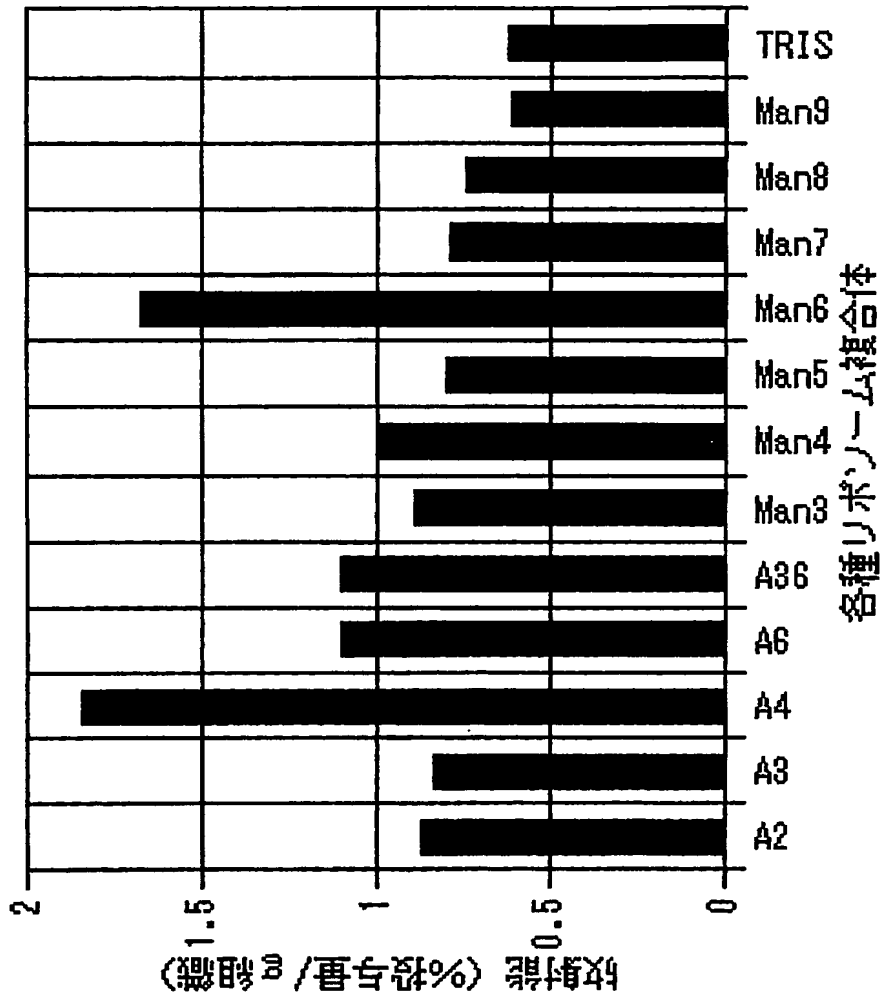












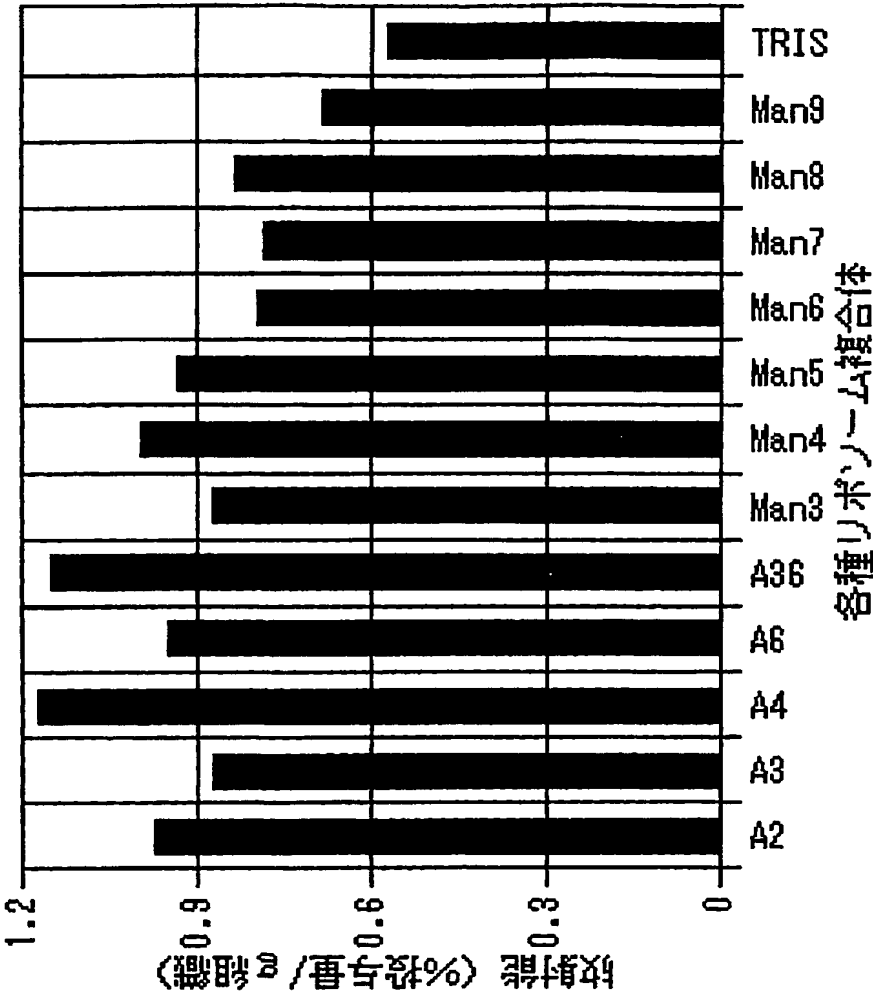


図 23

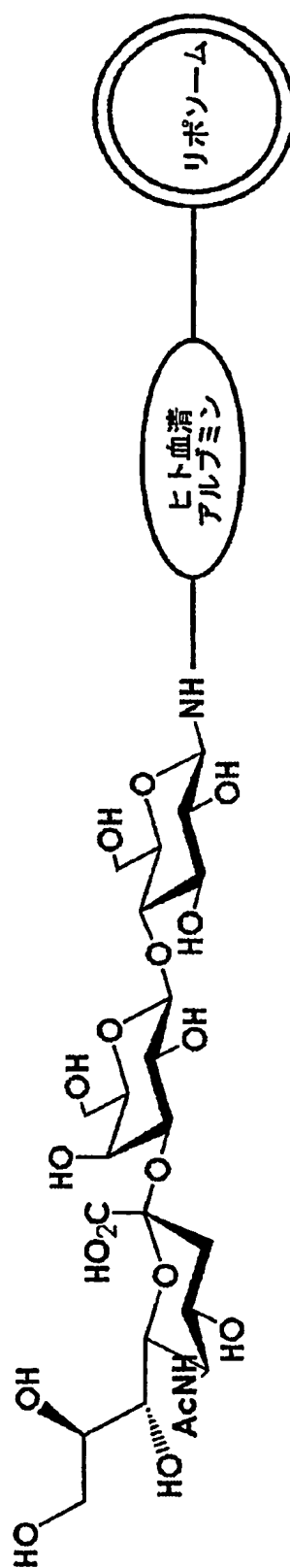


図 24

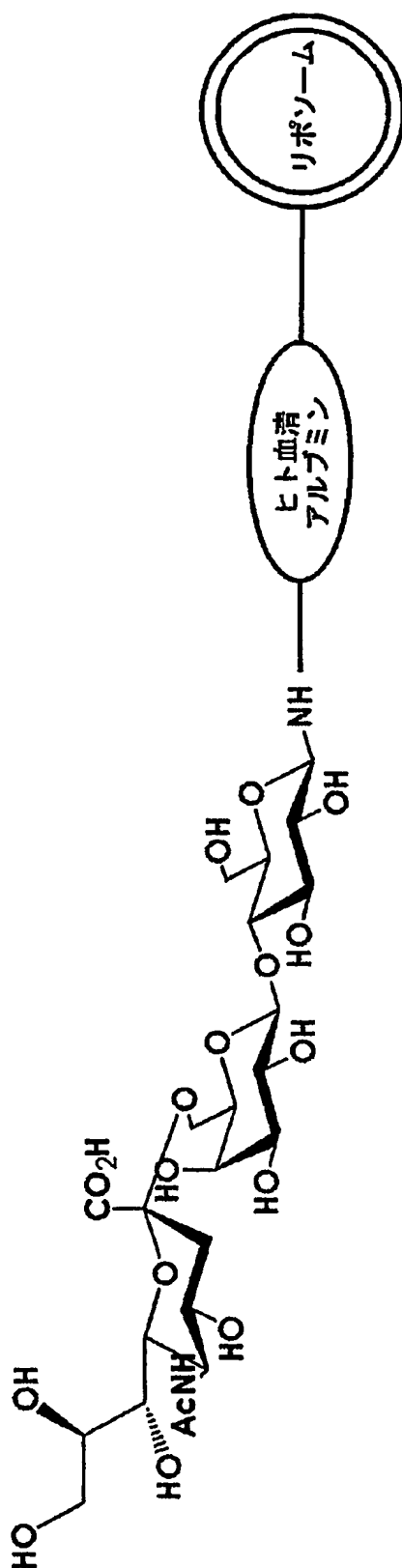
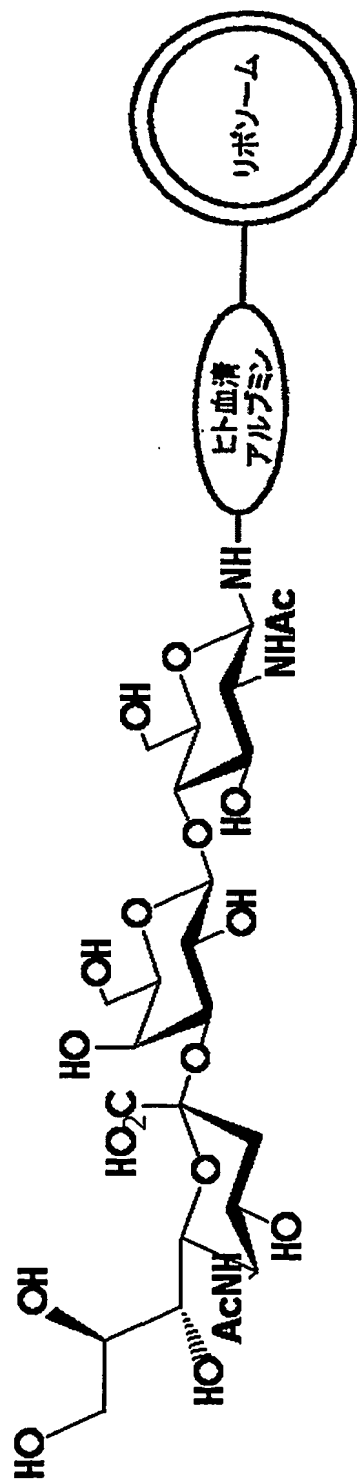


図 25



62

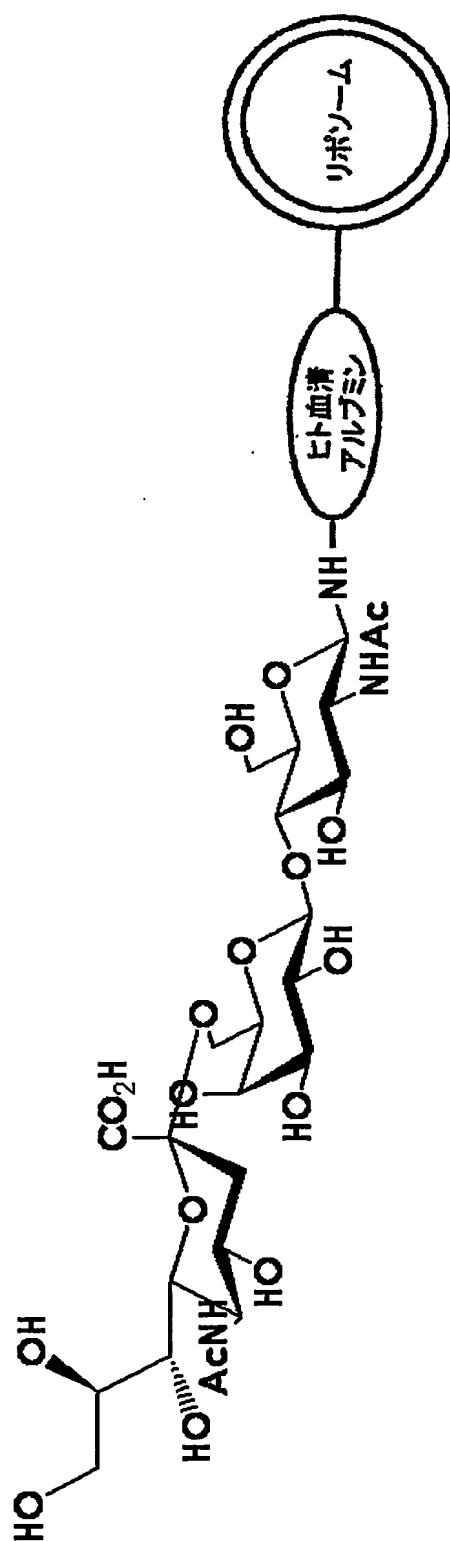
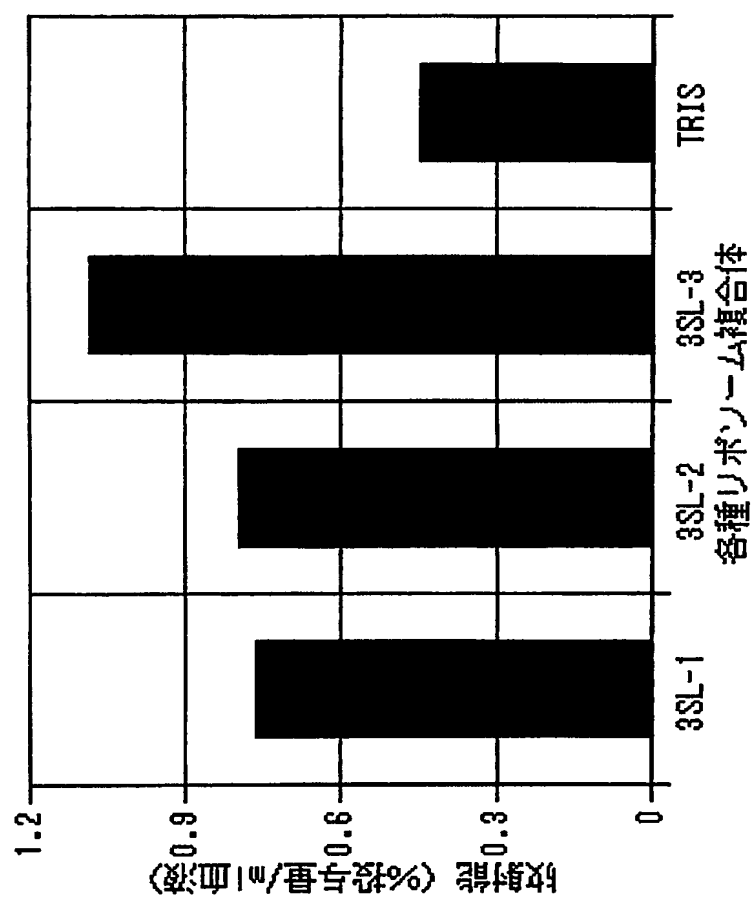
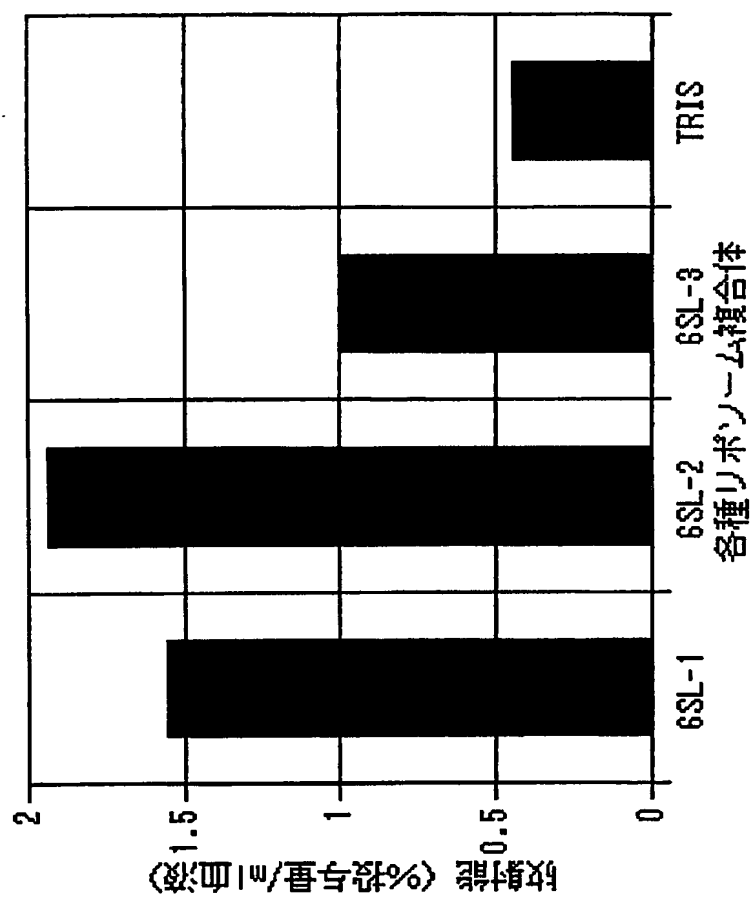
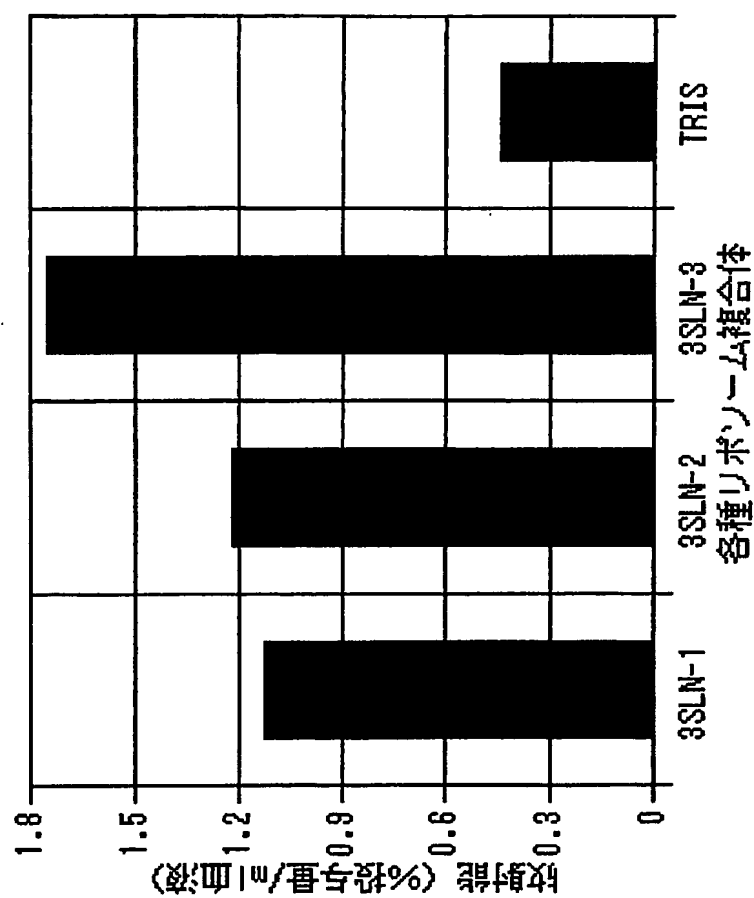


図 27







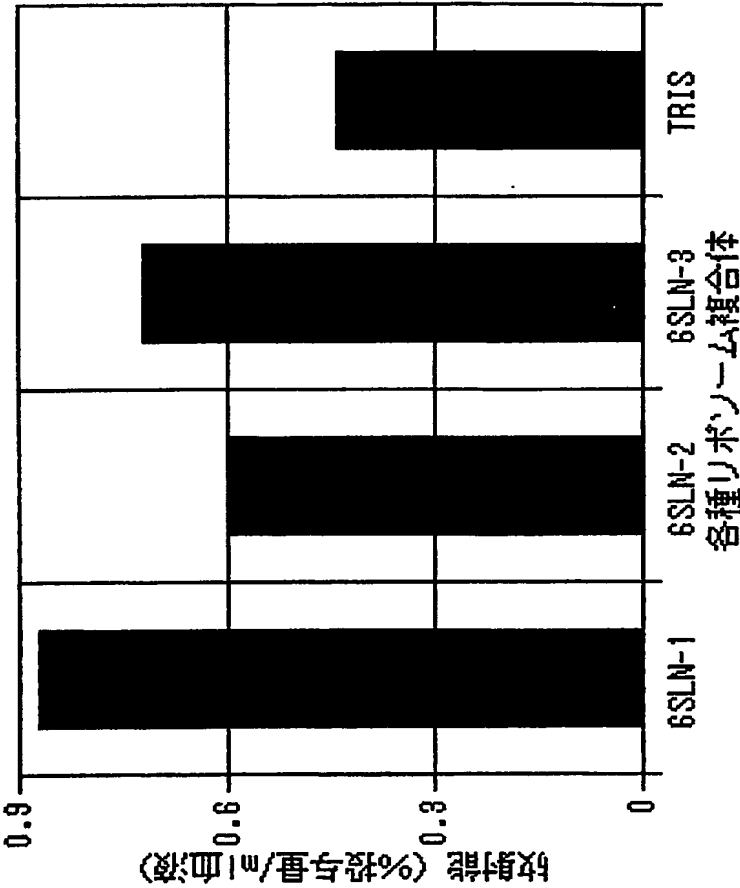


図 31

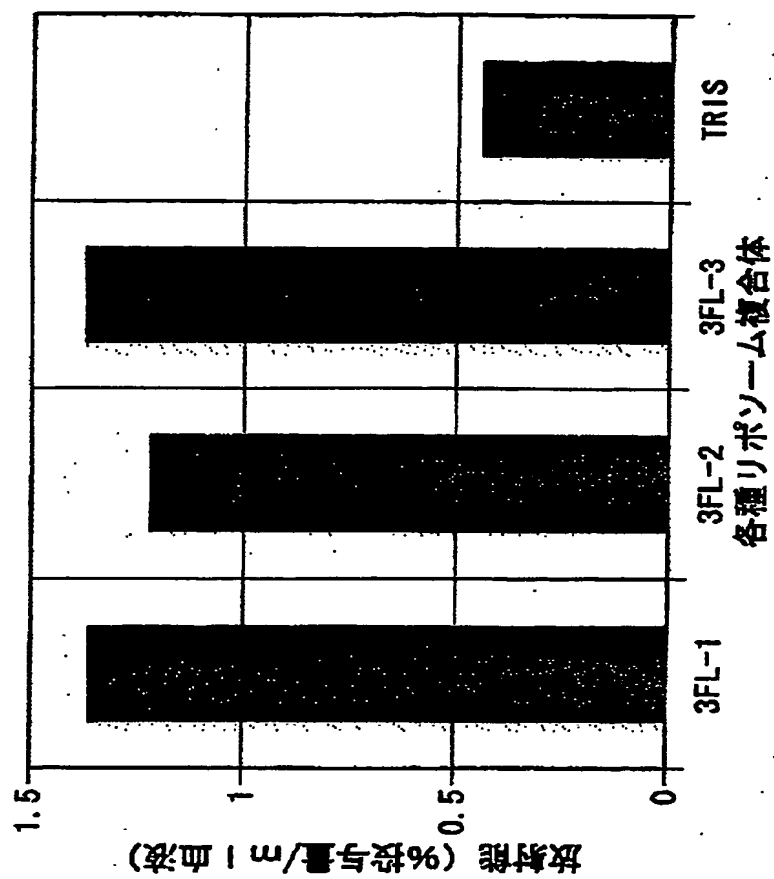
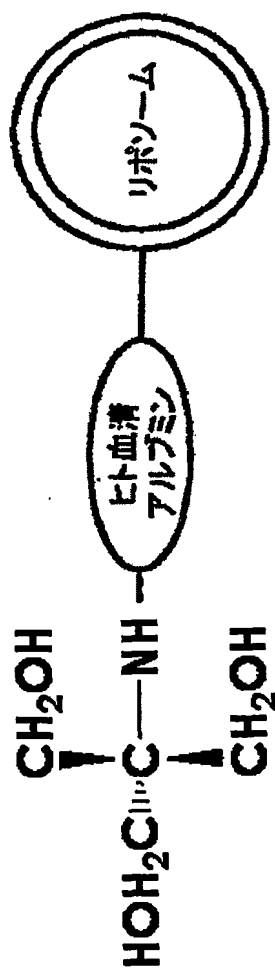
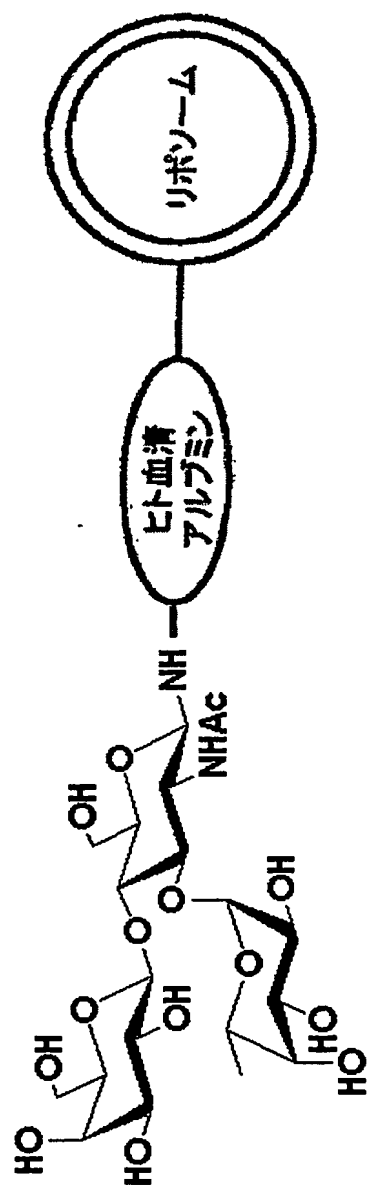


図 32





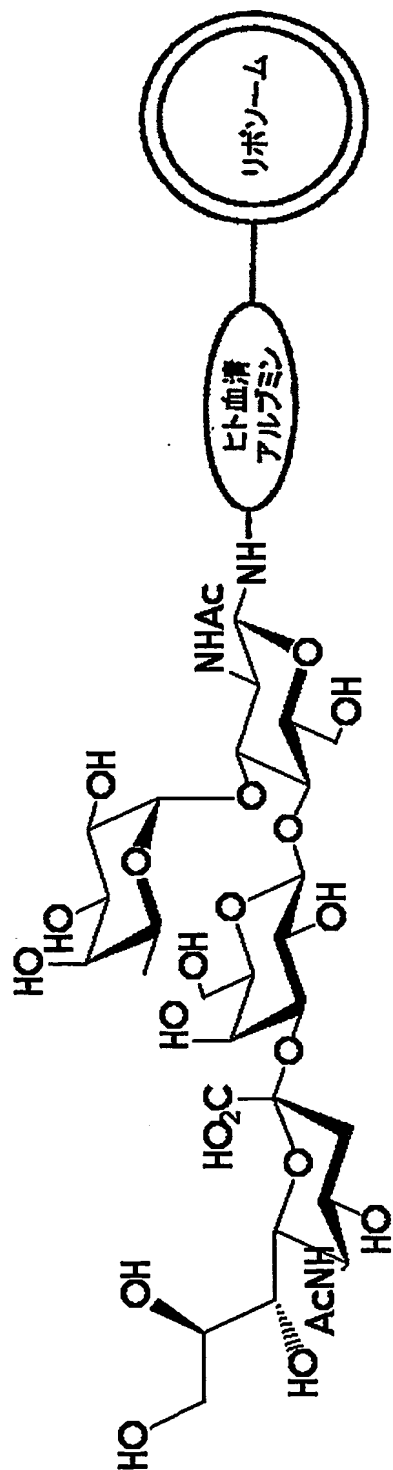


図 35

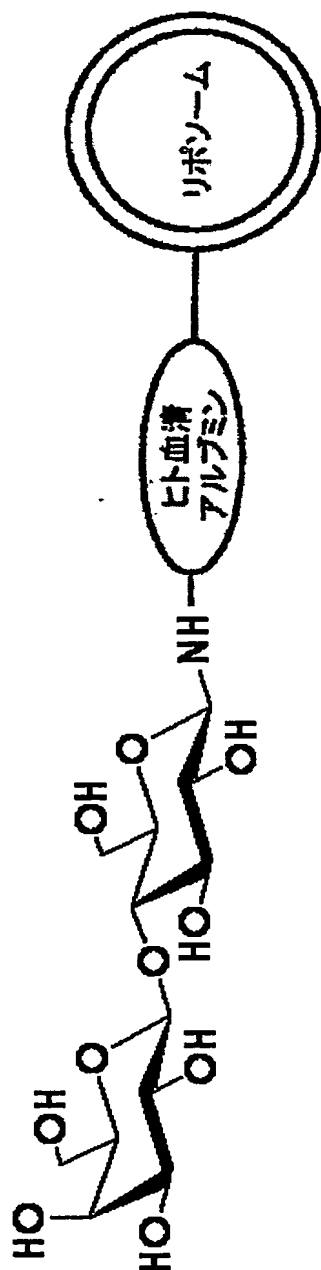


図 36

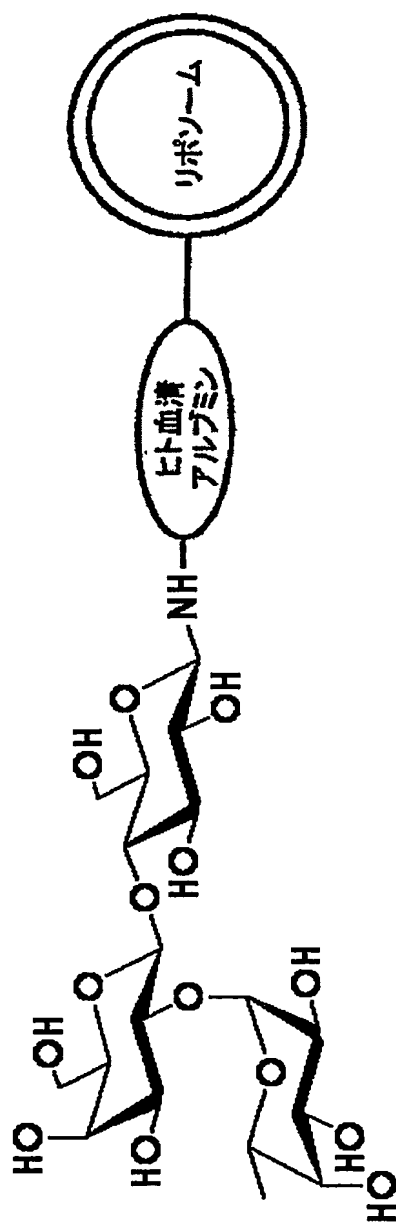
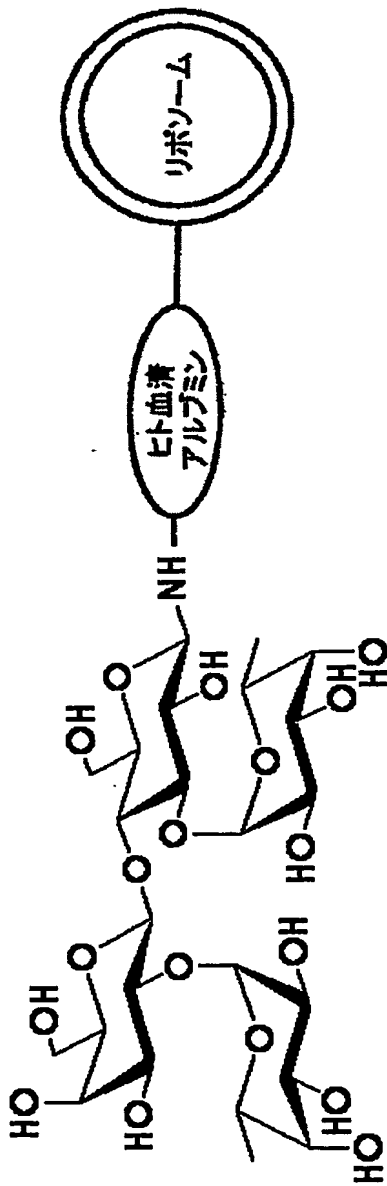
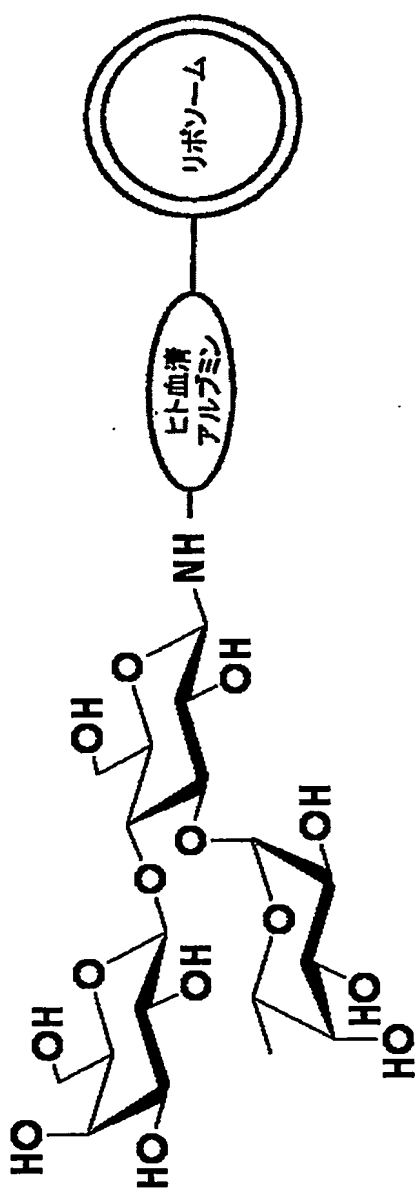


図 37



38



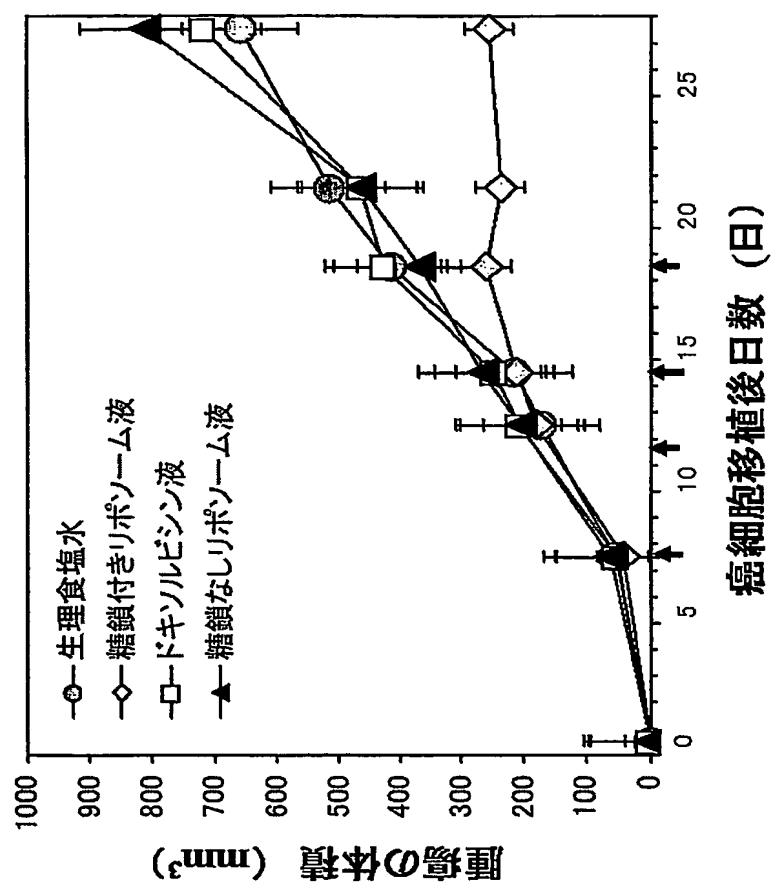


図 40

糖鎖付きリポソーム投与群



生理食塩水投与群



図 41

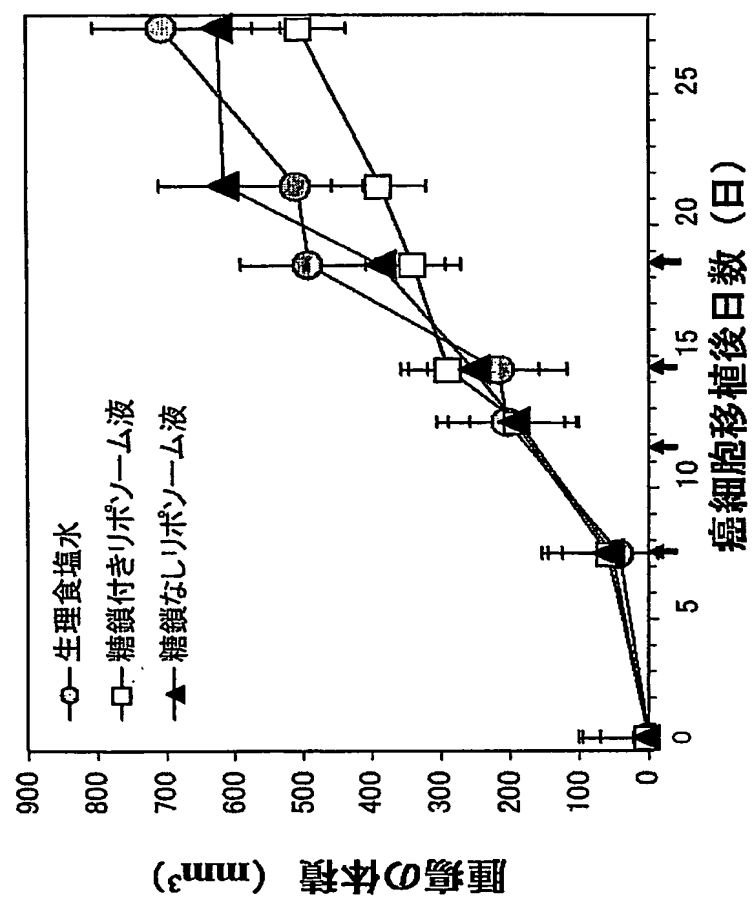
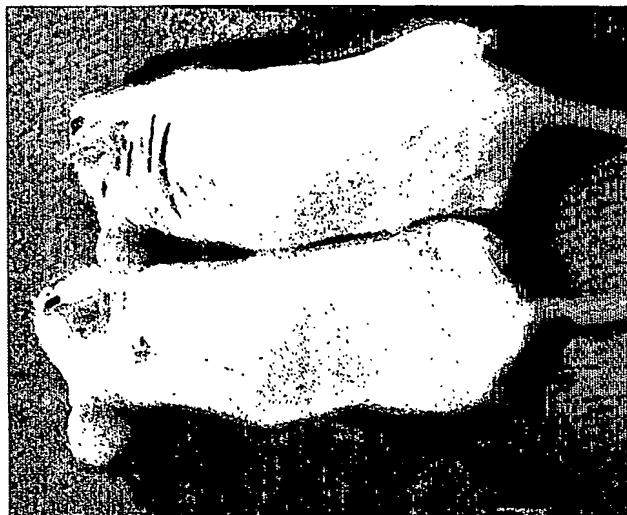


図 42

糖鎖付きリポソーム投与群



生理食塩水投与群



図 43

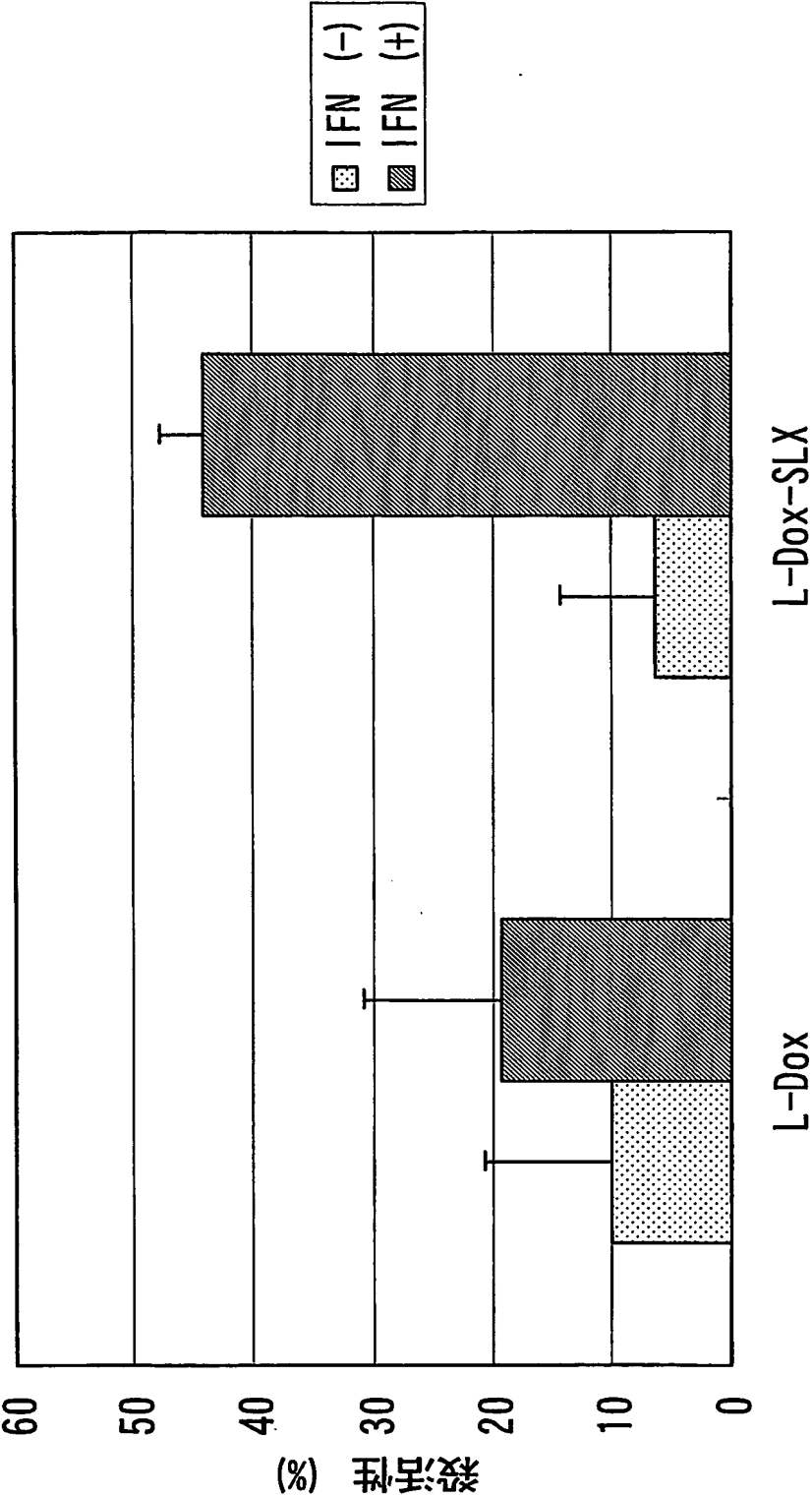


図 4

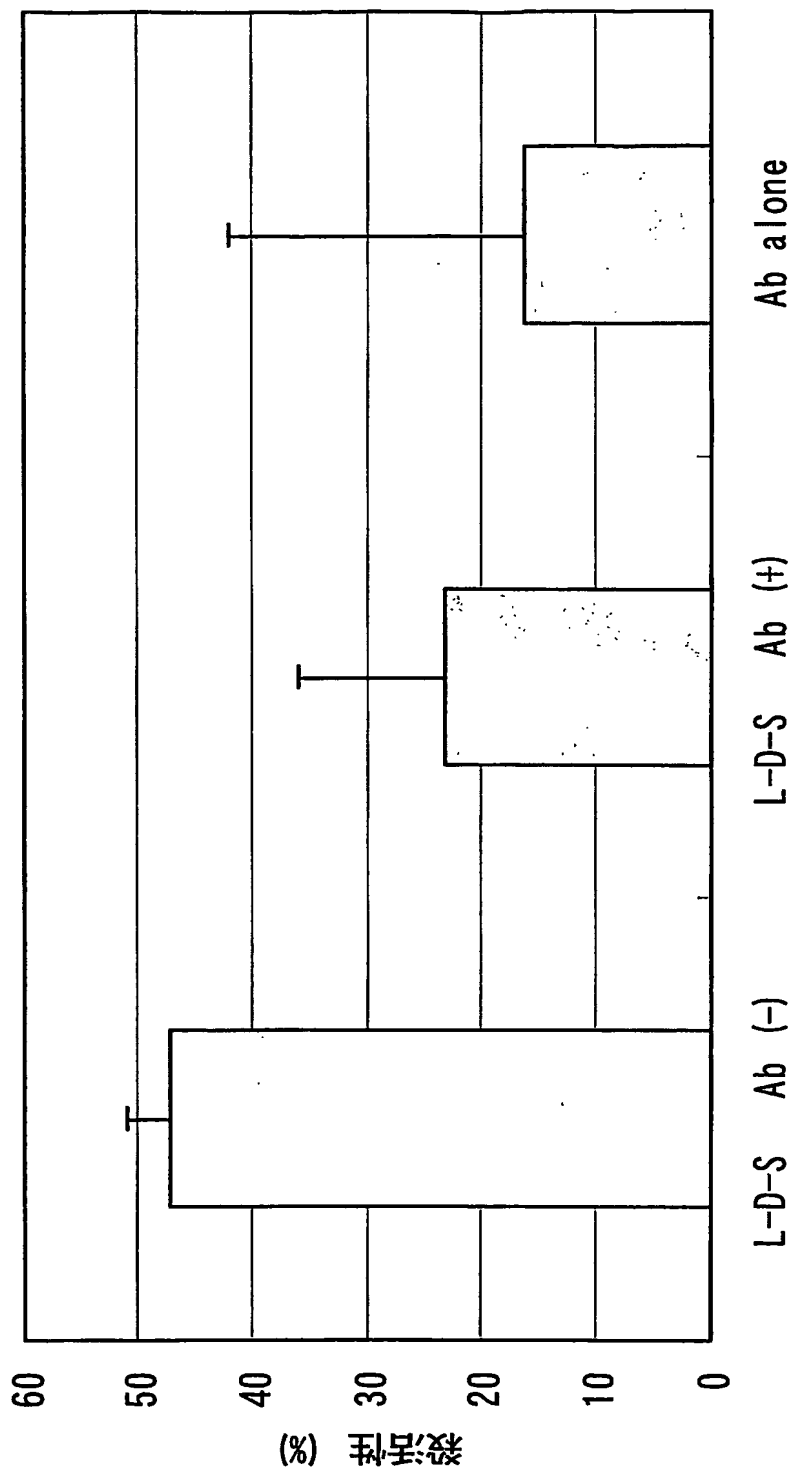


図 45

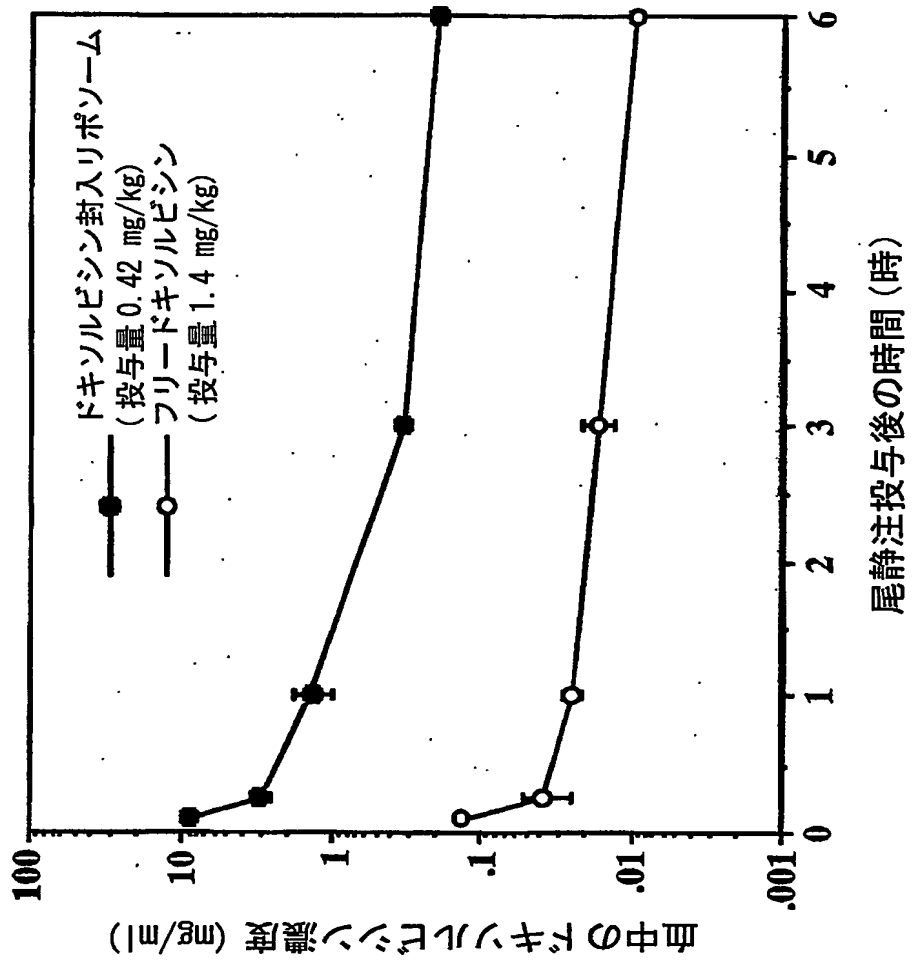


図 46

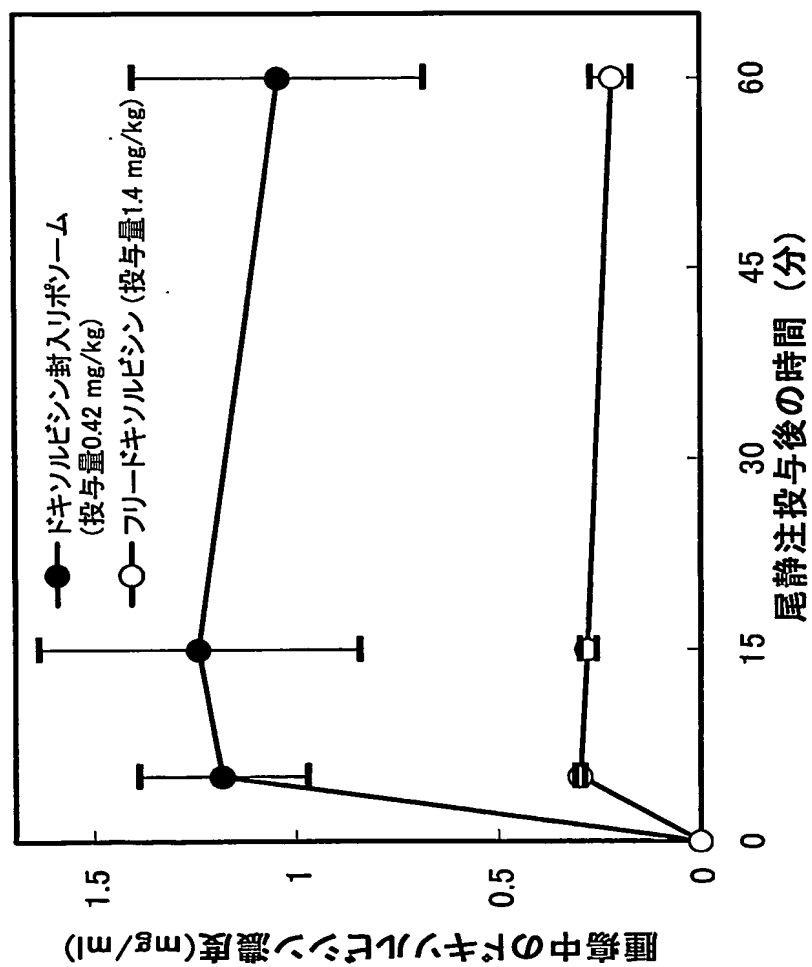


図 47

(A) フリードキシソルピシン
(投与量 1.4 mg/kg)



(B) ドキシソルピシン封入リポソーム
(投与量 0.42 mg/kg)

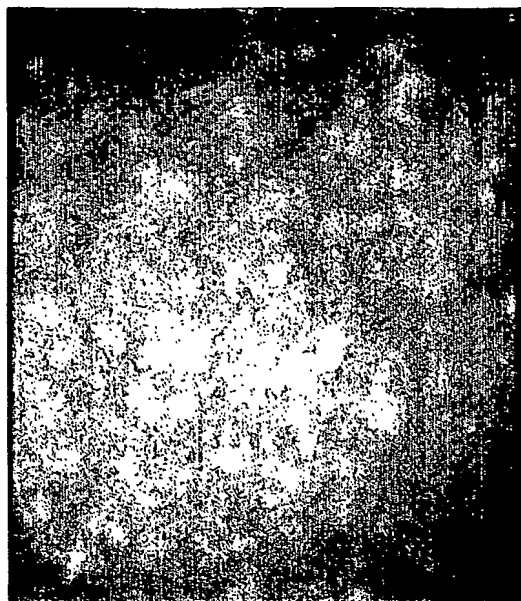


図 48

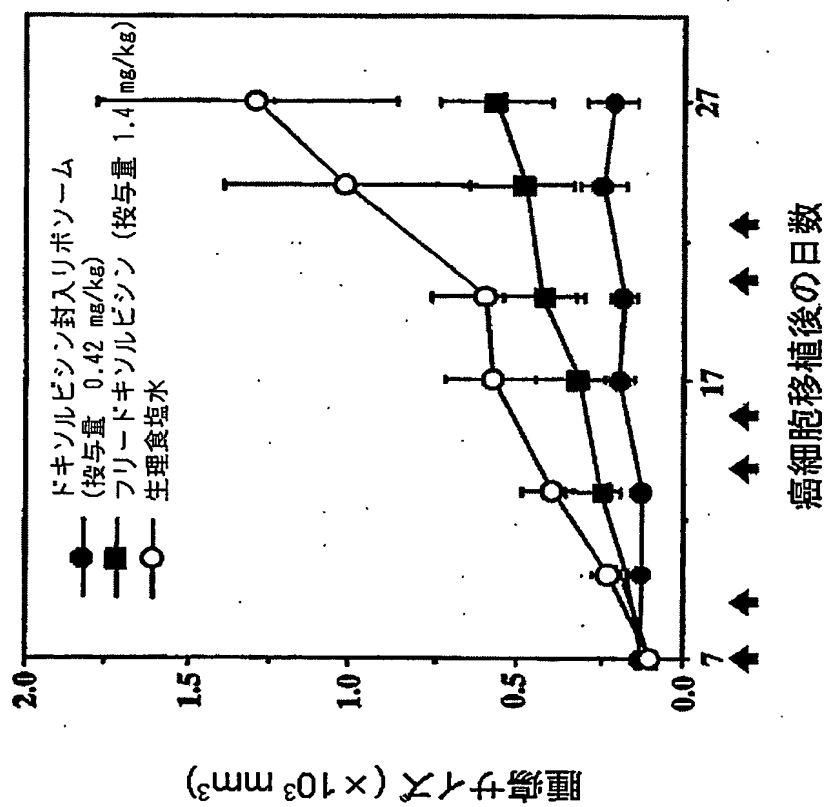


図 49

(A) 生理食塩水投与群



(B) ドキソルビシン封入リポソーム
投与群

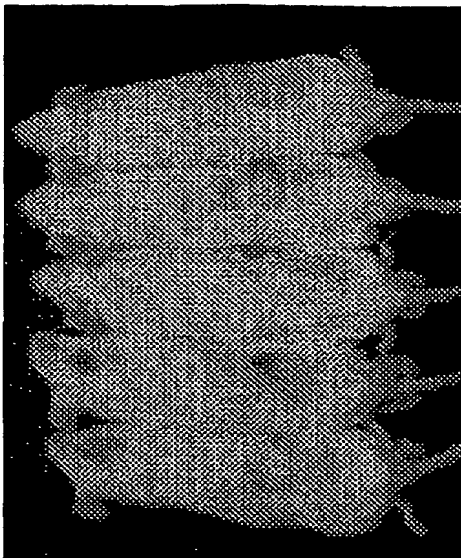


図 50

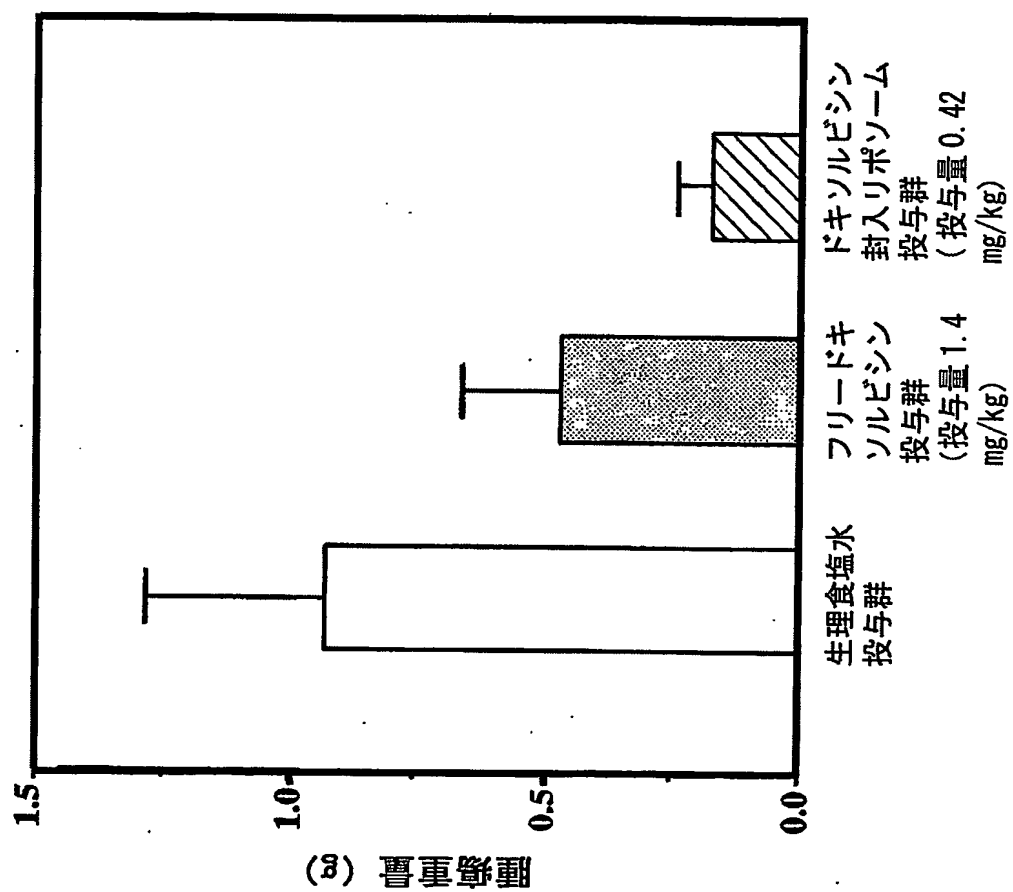
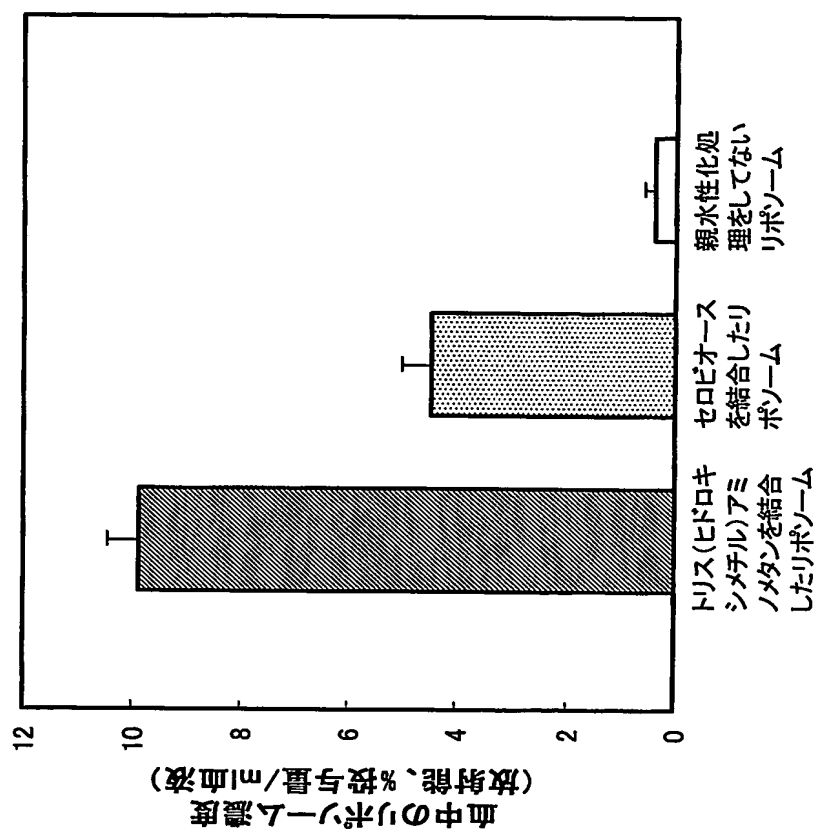


図 5 1



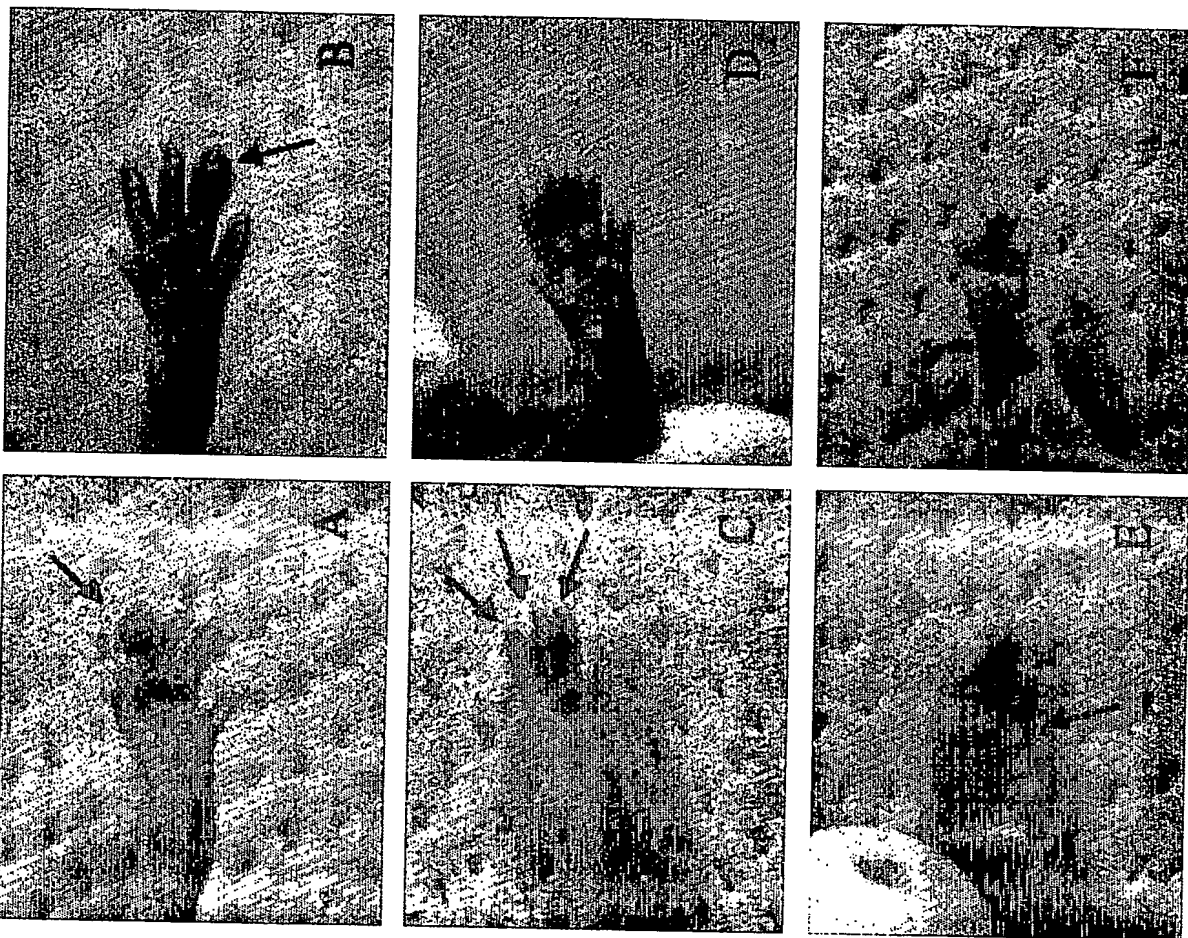


図 5 3

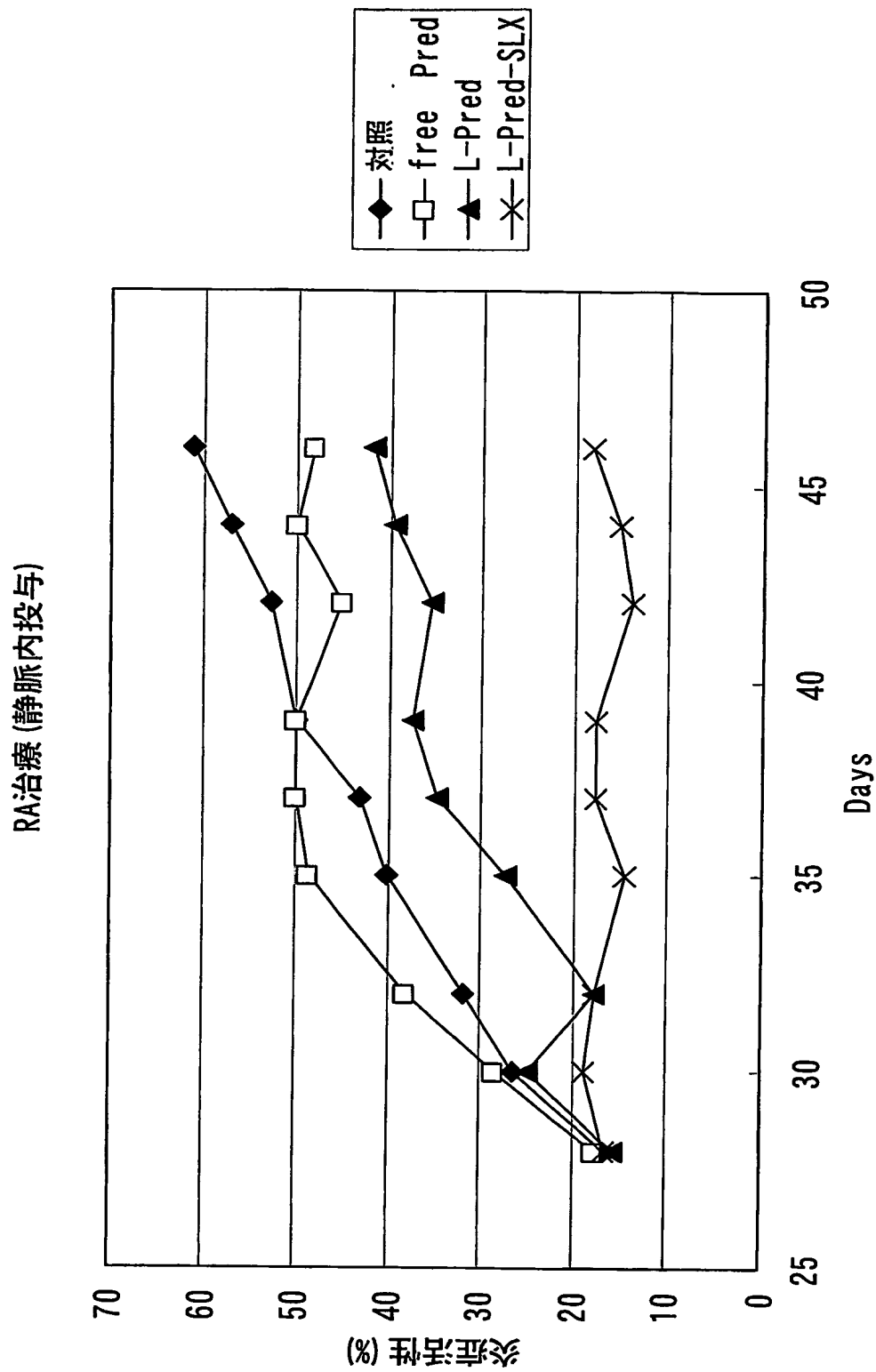


図 5 4

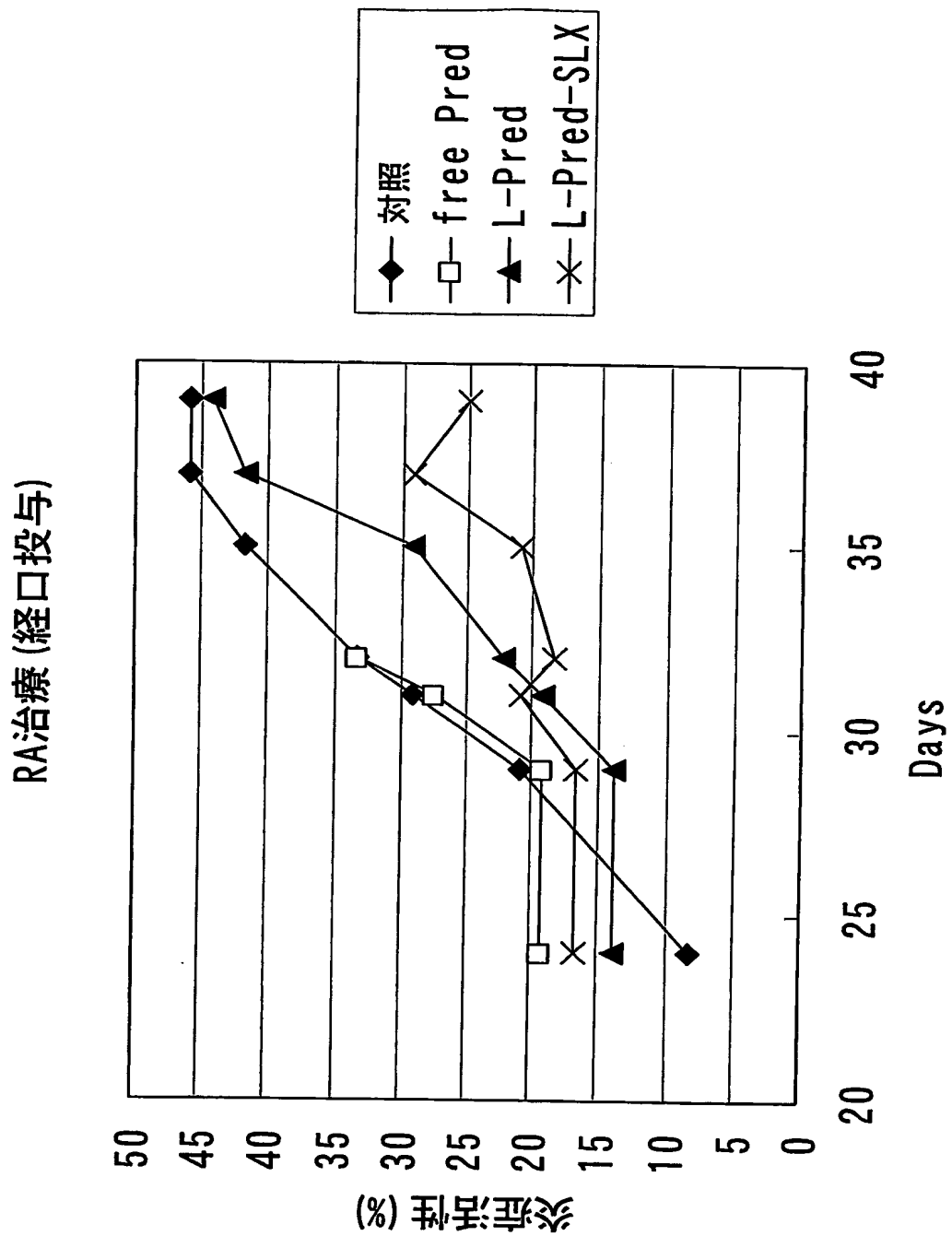
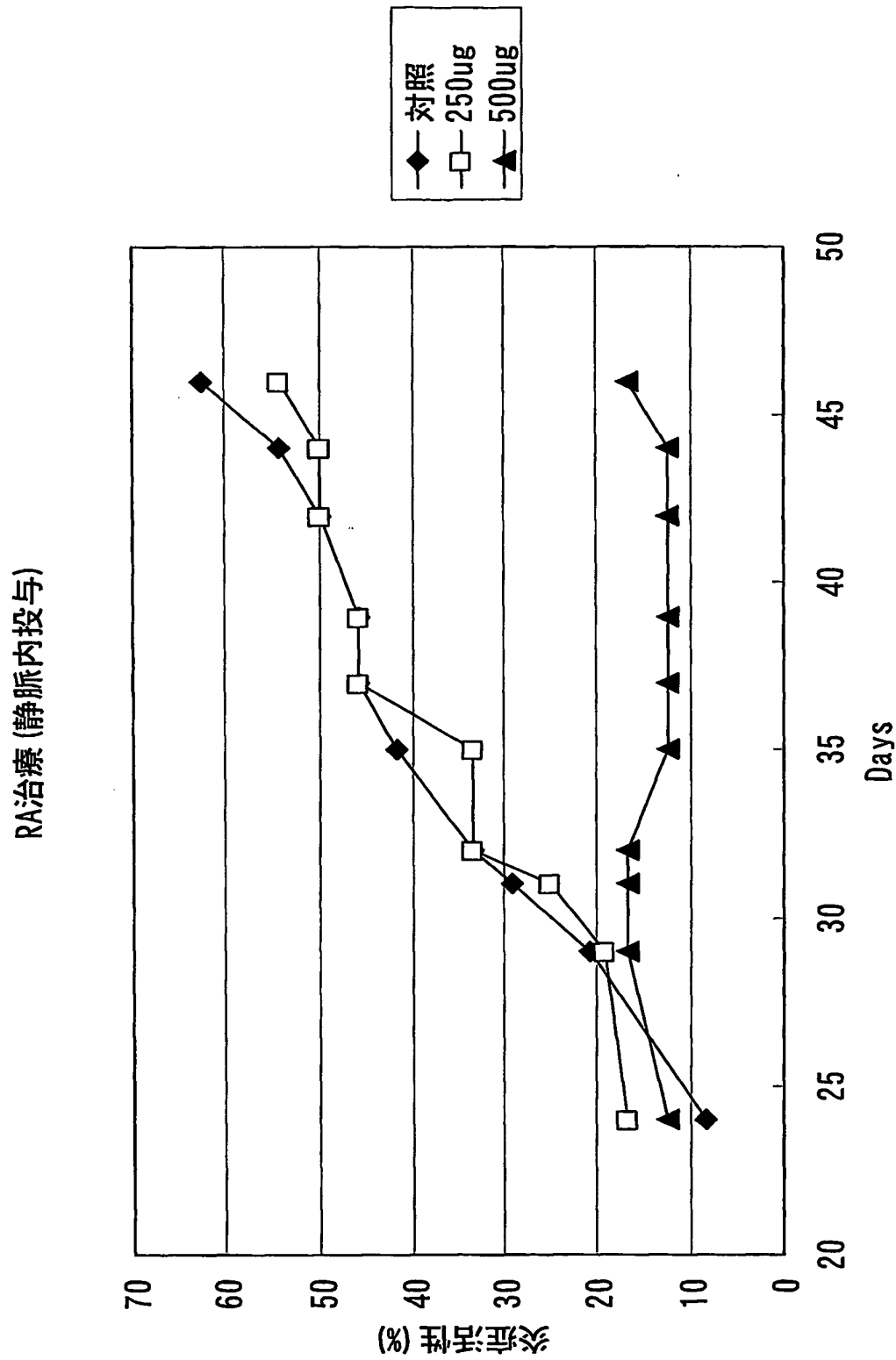


図 5 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011291

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K9/127, 47/24, 47/26, 47/28, 47/36, 47/42, 7/00, A61P35/00, A23L1/302, 1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K9/127, 47/24, 47/26, 47/28, 47/36, 47/42, 7/00, A61P35/00, A23L1/302, 1/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/0143267 A1 (YAMAZAKI, Noboru), 31 July, 2003 (31.07.03), Full text; particularly, Claims 1 to 15; examples 1 to 17 & JP 2003-226638 A & JP 2003-226647 A	1-78
X Y	YAMAZAKI, Noboru et al., Prepatation and Characterization of Neoglycoprotein- liposome conjugates: a promising approach to developing drug deliverly materials applying sugar chain ligands, Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2001, Vol.13, No.71, pages 319 to 329, full text	1-15, 27-41 16-26, 65-78

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 October, 2004 (20.10.04)

Date of mailing of the international search report
09 November, 2004 (09.11.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011291

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOLE, Labanyamoy et al., Synergistic effect of interferon- γ and mannosylated liposome-incorporated doxorubisin in the therapy of experimental visceral leishmaniasis, 1999, Vol.180, pages 811 to 820, full text	1-5, 7-9, 27, 29, 32, 34, 35, 37, 38
Y		6, 10-26, 28, 31, 33, 36, 39-41, 65-78
X	JP 2001-81044 A (Tokai University), 27 March, 2001 (27.03.01),	1-9, 27, 29, 31-34, 37
Y	Full text; particularly, Claims 1, 2	10-26, 28, 30, 35, 36, 38-41, 65-78
X	TAKEUCHI, Hirofumi et al., Passive targeting of doxorubicine with polymer coated liposomes in tumor bearing rat, Biol.Pharm.Bull., 2001, Vol. 24, pages 795 to 799, full text	42, 43, 45, 48, 50, 57, 58, 60-62, 64
Y		44, 46, 47, 49, 51-56, 59, 63
X	KAMPS, Jan A.A.M. et al., Massive targeting of liposomes, surfase-modified with anionized albumins, to hepatic endothelial cells, Proc. Natl.Acas.Sci. U.S.A., 1997, Vol.94, pages 11681 to 11685, full text	42-45, 50
Y		46-49, 51-64
X	HONG, Ruey-Long et al., Direct comparison of liposomal doxorubicin with or without polyethylene glycol coating in C-26 tumor-bearing mice: Is suface coating with polyethylene glycol beneficial?, Clinical Cancer Research, 1999, Vol.5, pages 3645 to 3652, full text	42, 43, 45, 48, 57, 58, 60-62, 64
Y		44, 46, 47, 49-56, 59, 63

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011291

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011291

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

It appears that the special technical feature of the invention according to claim 1 relating to "a sugar chain-modified liposome having a sugar chain bound to the liposome membrane" resides in bonding sugar chain to the liposome membrane, while the special technical feature of the invention according to claim 42 relating to "a liposome wherein the liposome membrane has been made hydrophilic and no sugar chain is bound to the surface thereof" resides in making the liposome membrane hydrophilic without binding to any sugar chain. Thus, no technical feature common to them can be found.

Such being the case, these inventions are not considered as being so linked as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ A61K9/127, 47/24, 47/26, 47/28, 47/36, 47/42, 7/00, A61P35/00, A23L1/302, 1/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ A61K9/127, 47/24, 47/26, 47/28, 47/36, 47/42, 7/00, A61P35/00, A23L1/302, 1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2004年
 日本国登録実用新案公報 1994-2004年
 日本国実用新案登録公報 1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN) BIOSIS (STN)
 REGISTRY (STN) EMBASE (STN)
 MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	US 2003/0143267 A1 (YAMAZAKI, Noboru) 2003. 07. 31, 全文, 特に請求項1-15, 実施例1-17 & JP 2003-226638 A, JP 2003-226647 A	1-78
X Y	YAMAZAKI, Noboru <i>et al</i> , Prepatation and Characterization of Neoglycoprotein-liposome conjugates: a promising approach to developing drug deliverly materials applying sugar chain ligands, Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2001, Vol. 13, No. 71, pp319-329, 全文	1-15, 27-41 16-26, 65-78

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に関する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 10. 2004

国際調査報告の発送日

09.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小堀 麻子

4 C

2938

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	KOLE, Labanyamoy <i>et al</i> , Synergistic effect of interferon- γ and mannosylated liposome-incorporated doxorubisin in the therapy of experimental visceral leishmaniasis, 1999, Vol.180, pp811-820, 全文	1-5, 7-9, 27, 29, 32, 34, 35, 37, 38
Y		6, 10-26, 28, 31, 33, 36, 39-41, 65-78
X	JP 2001-81044 A(学校法人東海大学)2001.03.27, 全文, 特に請求項1, 2	1-9, 27, 29, 31-34, 37
Y		10-26, 28, 30, 35, 36, 38-41, 65-78
X	TAKEUCHI, Hirofumi <i>et al</i> , Passive targeting of doxorubicine with polymer coated liposomes in tumor bearing rat, Biol. Pharm. Bull., 2001, Vol.24, pp795-799, 全文	42, 43, 45, 48, 50, 57, 58, 60-62, 64
Y		44, 46, 47, 49, 51-56, 59, 63
X	KAMPS, Jan A. A. M. <i>et al</i> , Massive targeting of liposomes, surfase-modified with anionized albumins, to hepatic endothelial cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1997, Vol.94, pp11681-11685, 全文	42-45, 50
Y		46-49, 51-64
X	HONG, Ruey-Long <i>et al</i> , Direct comparison of liposomal doxorubicin with or without polyethylene glycol coating in C-26 tumor-bearing mice: Is surface coating with polyethylene glycol beneficial?, Clinical Cancer Research, 1999, Vol.5, pp3645-3652, 全文	42, 43, 45, 48, 57, 58, 60-62, 64
Y		44, 46, 47, 49-56, 59, 63

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

別紙参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第Ⅲ欄

請求の範囲1に係る発明「糖鎖がリポソーム膜に結合されている糖鎖修飾リポソーム」の特別な技術的特徴は糖鎖をリポソーム膜に結合させることであり、請求の範囲42に係る発明

「リポソーム膜が親水性化されており、表面に糖鎖が結合していないリポソーム」の特別な技術的特徴はリポソーム膜を糖鎖に結合させることなく親水性化することであると認められるから、両者に共通する特別な技術的特徴を見出すことはできない。

したがって、これらの発明は単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。